Attorney's Docket No.: 16640-002001 / PE-23185-AM

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant	: Yu-Ju Liu et al.	Art Unit	: Unknown
Serial No.	: Not Yet Assigned	Examiner	: Unknown
Filed	: October 10, 2003		
Title	: ACID- AND BILE SALT-RESISTANT LACTOBACILLUS ISOLATES HAVING THE ABILITY TO LOWER AND ASSIMILATE CHOLESTEROL		

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC § 119 from the following application:

Taiwan Application No. 91132189 filed October 30, 2002.

A certified copy of this application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges to Deposit Account No. 06-1050, referencing Attorney Docket No. 16640-002001.

Respectfully submitted,

Date: 10-10-03

Y. Rocky Tsao

Y. Rocky Tsao
Reg. No. 34,053

Fish & Richardson P.C., P.A.
60 South Sixth Street
Suite 3300
Minneapolis, MN 55402
Telephone: (612) 335-5070
Facsimile: (612) 288-9696

20735413.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY EXPRESS MAIL

Express Mail Label No. EL983022160US

October 10, 2003
Date of Deposit

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2002 年 10 月 30 日
Application Date

申請案號：091132189
Application No.

申請人：食品工業發展研究所
Applicant(s)

局長
Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 9 月 23 日
Issue Date

發文字號：09220952360
Serial No.

双面影印

申請日期	
案號	
類別	

(以上各欄由本局填註)

A4
C4

發明 ~~新型~~ 專利說明書

一、發明~~創作~~名稱	中文	具有降低與同化膽固醇能力的新穎耐酸與耐膽鹽乳桿菌(*Lactobicillus*)分離株
	英文	Novel Acid- and bile salt-resistant *Lactobacillus* isolates having the ability to lower and assimilate cholesterol
二、發明~~創作~~人	姓名	1.劉玉茹2. 游金珠 3.譚靜芬4. 廖啟成
	國籍	1.2.3.4.中華民國
	住所	1. 新竹市食品路331號 2. 高雄市楠梓區後昌路546巷7弄4號之5 3. 新竹市明湖路400巷70弄7號 4. 新竹市食品路331號
三、申請人	姓名(名稱)	食品工業發展研究所
	國籍	中華民國
	住、居所(事務所)	新竹市食品路331號
	代表人姓名	劉廷英

裝

訂

線

四[illegible]文發明摘要（發明之名稱： 具有降低與同化膽固醇能力的新穎耐酸與耐膽鹽乳桿菌(*Lactobicillus*)分離株 ）

本發明揭示具有耐膽鹽與耐胃酸特性且同時具有降低與同化膽固醇能力之新穎乳桿菌(*Lactobicillus*)分離株。本案乳桿菌(*Lactobicillus*)分離株或其繼代培養後代或由此等所衍生出的突變株可被用於製備各式的食品產品，以及用於製備供治療與預防腸胃疾病以及降低血清膽固醇用的藥學組成物。

英文發明摘要（發明之名稱： Novel Acid- and bile salt-resistant *Lactobacillus* isolates having the ability to lower and assimilate cholesterol ）

Disclosed are novel acid- and bile salt-resistant *Lactobacillus* isolates having the ability to lower cholesterol. The present *Lactobacillus* isolates or their subcultured offspring or mutants derived therefrom can be used in preparation of various food products, and in the manufacture of medicaments for use in the treatment or prevention of gastrointestinal diseases and for use in lowing serum cholesterol.

（由本局填寫）

承辦人代碼：
大　　類：
ＩＰＣ分類：

A6
B6

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

本案已向：

國（地區）　申請專利，申請日期：　　案號：　　，□有　□無主張優先權

有關微生物已寄存於：	，寄存日期：	，寄存號碼：
食品工業發展研究所「生物資源保存及研究中心」(BCRC，簡稱生資中心)]	2002.06.18.	
Lactobacillus gasseri B21T1		CCRC 910195
Lactobacillus gasseri B21T6		CCRC 910196
Lactobacillus gasseri C21T1		CCRC 910198
Lactobacillus gasseri X21B7		CCRC 910199
Lactobacillus gasseri B38T38		CCRC 910197
嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)B6T7		CCRC 910194
美國類型培養物收集中心(ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA)	2002.06.21	
Lactobacillus gasseri B21T1		PTA-4483
Lactobacillus gasseri B21T6		PTA-4484
Lactobacillus gasseri C21T1		PTA-4479
Lactobacillus gasseri X21B7		PTA-4480
Lactobacillus gasseri B38T38		PTA-4481
嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)B6T7		PTA-4482

陸、(一)、本案指定代表圖爲：第 10 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

發明之背景

1. 發明之技術領域

本發明係有關於具有耐膽鹽與耐胃酸特性且同時具有降低血清膽固醇能力之新穎乳桿菌(*Lactobicillus*)分離株及其用途。

2. 相關技藝的描述

“乳酸菌(lactic acid bacteria)”為一群能發酵醣類並以乳酸為主要產物之細菌，其目前廣為接受的形態與生理特徵為：(1)革蘭氏陽性菌；(2)外形為球菌或桿菌；(3)過氧化氫酶試驗(catalase test)為陰性；(4)從其所代謝的葡萄糖可生成50%以上之乳酸；(5)不形成內生性孢子；以及(6)多不具運動性，可在微好氧情況下生長。

截至1980年眾所皆知的一般乳酸菌包含乳桿菌屬(*Lactobacillus*)、鏈球菌屬(*Streptococcus*)、明串珠菌屬(*Leuconostoc*)、片球菌屬(*Pediococcus*)等4個菌屬(W.C. Frazier and D.C. Westhoff, 1978, Food Microbiology, 3rd ed. McGraw-Hill, Inc., New York, USA)，而廣義的乳酸菌尚包括雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium*)與芽孢乳桿菌屬(*Sporolactobacillus*)這兩個菌屬。而近年來，微生物在分類體系上已可依據DNA相似性(homology)和rDNA序列比對分析而被明確獨立成為一個分類群組(taxonomic group)，並被賦予分類學上的位置。就申請人所知，截至1999年12月，乳酸菌家族已擴增至包含16個菌屬以及223個物種。

經由人類或動物宿主的攝食後，可改善該人類或動物

宿主的腸內微生物相平衡的單一或混合菌種是為所謂的益生菌(probiotics)(*O'sullivan et al. (1992), Trends in Food Sci. Technol., 3:309-314; Fuller, R., P.J. Heidt, V. Rush and D. van der Waaij. (eds.) (1995), Probiotics: prospects of use in opportunistic infections. Old Herborn University Seminar Monograph No. 8, pp.1*)，其中最為人所熟知及使用的益生菌是乳桿菌(*Lactobacillus*)與雙歧桿菌(*Bifidobacterium*)。

自 1908 年 Eli Metchnikoff 提出「食用含乳桿菌之酸乳，可以取代正常存在於腸內之產毒菌體，而不僅有益健康更能延年益壽」(*Eli Metchnikoff, 1908, The Prologation Of Life, Ed. P. Chalmers Mitchell, G.P. Putnam's Sons, The Knicherbocker Press, New York & London*)的理論後，近年來的研究及臨床試驗結果也顯示「乳桿菌與健康具有重要關連性」。乳桿菌因此受到廣泛的重視。

乳酸菌不僅能在腸道複雜的生態系中佔有一席之地，而且對宿主還有健康上的助益。乳酸菌已被發現的功效包括增進宿主所攝食的食物之營養品質與促進維生素合成及酵素產生(*J. Denter and B. Bisping, 1994，Int. J. Food Microbiol., 22:23-31*)、抑制腸道內致病菌的生長以及安定腸道內正常菌相平衡(*Hose, H. and Sozzi, T. (1991), J. Chem. Technol. And Biotech. 51:540-544*)、產生抗體物質增加宿主之抵抗力(*H. Majamaa et al. (1995), Journal of Pediatric Gastro-enterology and Nutrition, 20:333-338*)以及降低大腸癌之風險及抑制腫瘤(*E.J. Schiffrin et al., 1997, Am. J. Clin.*

Nutr., 66:515S-520S)。同時，亦有研究顯示，服用經乳桿菌發酵的乳品也可以降低血清膽固醇的含量。

心血管疾病被列為工業國家人民之一主要死因。在美國，因心血管疾病而死亡的人數多於癌症及其他疾病，其中有四分之三之死因係歸因於粥狀動脈硬化(atherosclerosis)及其併發症，而高血清膽固醇是造成心血管疾病及粥狀動脈硬化的原因之一(*Kannel et al. (1979), Ann. Intern. Med., 90:85-91; Pekkanen et al. (1990), New England J. Med., 322: 1700-1707*)。在台灣地區，近年來腦血管及心臟疾病亦一直名列十大死因前茅，且更是老年人最主要的病因與死因，因此，高膽固醇血症是一不容忽視的病因。

1974年Mann及Spoerry發現，飲用經乳桿菌發酵後的發酵乳(yogurt)可降低人體血清膽固醇濃度，而食用新鮮牛奶則無影響(*Am. J. Clin. Nutr., 27:464-469, 1974*)。因此，近年來人們對乳酸菌降低膽固醇的處理與功效進行了廣泛的研究。

1982年，K.K. Grunewald於*J. of Food Science, 47:2078-2079*中報導，當大鼠被餵食以含有經過嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)發酵之10%發酵乳的食物歷時4週後，其血清膽固醇濃度被顯著地下降。1989年，Danielson等人於*J. Anim. Sci., 67:966-974*中報導，以經嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) LA16分離株發酵的嗜酸菌發酵乳(*acidophilus* yogurt)來餵食被給予高膽固醇飲食

之豬隻歷時56天後，會降低豬隻的血清膽固醇與低密度脂蛋白(LDL)，而對血清三酸甘油脂與高密度脂蛋白(HDL)則無效用。

上述有關嗜酸乳桿菌(Lactobacillus acidophilus) LA16分離株的論文，是Dr. khem M. Shahani所領導的研究群組所進行的有關嗜酸乳桿菌(Lactobacillus acidophilus)的特性與生物活性的多項研究之一。特別地，Dr. khem M. Shahani所領導的研究群組曾針對一人類來源的嗜酸乳桿菌(Lactobacillus acidophilus) DDS-1分離株的特性與生物活性而進行相當多的研究，其中包括降低血清膽固醇位准(serum cholesterol level)的研究，該DDS-1分離株後來有獲得專利權保護(參見Nebraska Cultures, Inc.公開於網際網路上有關於DDS-1™之資料，http://www.nebraskacultures.com.benefits.html)。

1997年，Akalin等人比較一般的發酵乳[由嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)及德氏乳桿菌物種(*Lactobacillus delbrueckii sp.*)發酵而來]與嗜酸菌發酵乳[由嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)及嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)發酵而來]對於老鼠血清膽固醇之影響，而發現嗜酸菌發酵乳降低血清膽固醇濃度的能力明顯要高於一般的發酵乳(*A.S. Akalin et. al. (1997), J. Dairy Sci., 80:2721-2725*)。

1998年Smet等人於*British J. of Nutrition, 79:185-194*中報導：豬隻在食用嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)

的第3至7週內，糞便中膽鹽中的排出量有明顯增加，且在第3至7週內，豬隻體內總血清膽固醇濃度也有明顯的下降。因此，乳桿菌所具有的BSH之酵素活性，可能是造成試驗豬隻的血清膽固醇降低的作用機制之一。

人體內的膽固醇可由肝臟自行合成，也可由動物性食物中攝取。膽固醇的排泄作用途徑有二：(1)因肝臟的代謝作用而形成膽酸(cholic acid)，繼而與甘胺酸(glycine)或牛磺酸(taurine)結合而可溶於水，再與鉀或鈉離子形成諸如甘胺膽酸鹽(glycocholates)或牛磺膽酸鹽(taurocholates)等之膽鹽(bile salts)，此等鹽類可經由糞便被排出體外；以及(2)形成類固醇激素(steroid hormone)，再因激素的代謝作用而由尿中排出體外，但此途徑只佔小部分。

膽鹽是膽固醇代謝過程中的水溶性終產物物質，而這些膽鹽可能進入至腸肝循環中，因為腸內菌[包括：乳桿菌屬(*Lactobacillus*)、腸球菌屬(*Enterococcus*)、消化鏈球菌屬(*Peptostreptococcus*)、雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium*)、梭菌屬(*Clostridium*)和類細菌(*Bacteroid*)等]的膽鹽水化酶(bile salt hydrase, BSH, E.C.3.5.1.24)之酵素作用可使膽酸與甘胺酸或牛磺酸分開，而產生去結合的膽鹽(deconjugated bile salts)。該等去結合的膽鹽不溶於水，且易與血清中膽固醇形成共沈澱作用(co-precipitation)而被排出體外。

除上述之外，據報導，膽固醇的代謝機制尚有同化作用(assimilation)及共沈澱作用(co-precipition)。

1985年，S.E. Gilliland等人於Appl. Environ. Microbiol,

49: 377-381 中報導，嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)對膽固醇有吸附及同化作用，且在 0.3%牛膽汁(oxgall)的環境下，乳桿菌降低膽固醇的能力較佳。同樣地，Noh 等人於 *J. Dairy Sci. (1997), 82: 3107-3113* 中報導，嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)的細胞膜可鍵結膽固醇，而被吸附的膽固醇會進一步被同化代謝成細胞所需物質。

另一方面，F.A.M. Kalver 和 R. van der Meer 於 *Appl. Environ. Microbiol (1993), 59: 1120-1124* 中報導，乳桿菌(*Lactobacillus*)和雙歧桿菌(*Bifidobacterium*)對於膽固醇沒有同化作用，而是在 pH 值低於 6.0 時，由於菌體對膽鹽的共軛活性增加(此現象也可能和菌體所具有的 BSH 活性有關)，而使膽固醇與膽鹽形成共沉澱，從而降低了培養基中的膽固醇含量。

1997 年，M.M. Brashears 和 S.E. Gililland 指出，在不控制 pH 值的情況下(即正常 pH 值為 4.5 至 5.5)，乳桿菌具有良好的膽固醇共沈澱作用，而若控制 pH 值維持在 6.0 左右，該菌降低膽固醇的能力明顯地減低(*M.M. Brashears and S.E. Gililland (1997), Influences of pH during growth on removal of cholesterol from MRS broth by Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus, Animal Science Research Report, pp.32-37;* http://www.ansi.okstate.edu/research/1997rr/006.htm)。

1998 年，張佳程與駱承庠以高脂乳、食用油脂來進行試驗，而認為"同化作用"是乳酸菌得以降低膽固醇之主要作用。(張佳程與駱承庠(1998), "乳酸菌對食品中膽固醇脫

除作用的研究--乳酸菌菌種(株)的篩選,” 食品科學(中國), 19:20-22)。

1999年，Usman及Hosono於*J. Dairy Sci., 82: 243-248*中報導，一種新發現的乳桿菌物種*Lactobacillus gasseri*在無膽鹽的培養條件下可吸收膽固醇。

以生物方法來降低人體血清膽固醇含量是一種比較經濟且有效的方式。而由以上文獻資料可知，乳酸菌在活體內(*in vivo*)和活體外(*in vitro*)均可能展現出有效的降低膽固醇效用，其中可能之作用機制包括了膽鹽水解酶之去結合作用、膽固醇與去結合的膽鹽於酸性pH值下所產生共同沉澱作用以及乳酸菌細胞對膽固醇的同化作用。

但乳酸菌在被攝入人體後，會面臨人腸胃環境壓力以及對腸道吸附性之專一性，因此，乳酸菌要在腸道中發揮功效，首先就必須要能克服消化道的惡劣環境，並能夠定殖(colonization)於腸道。再者，嗜酸乳桿菌是一群營養要求複雜的菌種，除在發酵乳品中較穩定外，其餘市售的各種以乾燥菌粉或其他加工型態(粉末狀、粒狀及錠狀)所製成之產品，菌體經長時間於室溫或冷藏儲存下皆存活不易，而造成菌數不易維持在起始儲存的數目，因此，市售非發酵乳品的產品內所含實際菌數，往往不及其包裝上所標示的菌數。是以，在乳酸菌產品之產製上，在銷售及儲存過程中如何維持乳酸菌的菌數，是一極為重要的課題。而具有耐酸、耐膽鹽及良好降低血清膽固醇能力等特性之菌株的篩選，是開發優良乳桿菌產品之一重要目標。

從上述可知，若在篩選菌種時直接針對菌株之耐酸、耐膽鹽以及儲存安定性等特性來進行篩選，可以節省後續製程的開銷，更可將所篩選得的菌株做更廣泛的應用。而分離源及地域性也與有效菌株之選出有關，因此，近年來人體來源即成為菌株篩選源之一主要訴求。

目前，在日本厚生省所核准的171件特定保健用食品中，有36件(約佔全部的21%)為益生性菌種，但產值卻佔總數的82%。在歐洲，益生性菌種於食品市場之產值高達10億美元。在美國，2000年酸酪乳之銷售值即達18.6億美元。在我國，於2000年，益生性菌種的市場已成長至42億元，而產品的應用形式也從發酵乳品、牛奶、冰淇淋、糖果、膳食補充劑等逐年擴增，應用的對象更包含了成人、嬰兒及各種家禽、家畜類。由此可預期，益生性菌種的市場有一廣大的成長空間。

截至目前為止，世界各地對乳酸菌的發展研究眾多，其中有關於乳桿菌菌株之耐酸性以及降膽固醇能力之已公開的專利與發表文獻，大多以嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)菌株為主，且主要是揭示膽鹽耐受性及耐酸性菌株，或是僅有強調降低膽固醇能力及膽鹽耐受性部分。目前有關乳桿菌之膽鹽耐受性的研究，是強調菌株可於含0.3%甘胺膽酸鹽(glycocholate)下生長，而耐酸性則以出現於胃液分泌初期之pH 2來進行耐胃酸狀態試驗。

查諸已公開的專利，乳桿菌降低血清膽固醇能力約在20%左右，而在發表文獻方面，依照使用方法而有10～80%

左右之差異。

在 US 4,839,281、US 5,032,399 中提到一種由人類糞便分離出的嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) GG (ATCC 53103)，其可生長於含 0.15%膽鹽中，而其在 pH 1～2 之酸性環境下培養 2 小時後的菌數殘存數為 10^3 CFU。

S.E. Gilliland 與 D.K. Walker 於 *J. Dairy Sci. (1990), 73:905-911* 中報導，由豬隻為來源之嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) ATCC 43121 (對應於 CCRC 17064)及由人類來源之嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) ATCC 4356 (對應於 CCRC 10695)皆可在含 0.3%膽鹽中生長，並具有降低血清膽固醇能力。

又，Danieloson 等人於 *J. Anim. Sci. (1989), 67:966-974* 中所報導的由豬隻分離出的嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) LA16 菌株以及 Dr. khem M. Shahani 等人所研究並成為 Nebraska Cultures, Inc.之專利產品的人類來源的嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) DDS-1 分離株(其係為內源性人類菌株)被顯示為具有降低血清膽固醇的能力(參見 http://www/nebraskacultures.com./benefits.html)。

Usman 及 Hosono 於 *J. Dairy Sci. (1999), 82: 243-248* 中報導，一株被分離出的乳桿菌物種 *Lactobacillus gasseri* 具有耐酸、耐膽鹽及降膽固醇能力。

Yoshio Saito 與 Jun Mizutani 在 US 5,516,684 與 US 5,707,584 中揭示兩種嗜酸乳桿菌菌株，亦即嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) FERM-P-14204 與嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*)

FERM-P-14205，此等菌株不會展現膽汁酸的去結合作用、不會抑制養份吸收以及會降低血液與肝中的膽固醇。

就上述所提之非本土來源的乳桿菌菌株，若能由本土分離篩選出具有耐酸、耐膽鹽及良好降低血清膽固醇能力等特性之本土性乳桿菌菌株，應較能確保其於國人腸道環境之適應性，這樣的本土性乳桿菌菌株在作為菌元(starter)或是添加至加工產品中，可確保食用後有效到達腸內並定殖之訴求，而因此提高產品之機能性。

發明之概要說明

於是，本發明之第一方面是從本土人類樣品中篩選出具有耐酸、耐膽鹽及良好降低血清膽固醇能力等多重特性之乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株(isolates)。

申請人以台灣本土健康幼兒糞便作為菌株分離來源，就腸胃環境耐酸性、膽鹽耐受性與降低膽固醇能力來篩選所分離出的菌株，而得到6株具有此等多重特性之新穎乳桿菌分離株，即 *Lactobacillus gasseri* B21T1、B21T6、C21T1、X21B7 與 B38T38，以及嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) B6T7，此等分離株已於西元2002年6月18日寄存於食品工業發展研究所(中華民國台灣省300新竹市食品路331號)，寄存編號分別為 CCRC 910195、CCRC 910196、CCRC 910198、CCRC 910199、CCRC 910197 以及 CCRC 910194。此等分離株亦有依據布達佩斯條約之規定，於西元2002年6月21日被寄存於美國類型培養物收集中心(ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA)，寄存編號分別為 PTA-4483、 PTA-4484、PTA-4479、PTA-4480、PTA-4481以及PTA-4482。

經與習知菌株嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) ATCC 43121、ATCC 4356與DDS-1比較，本發明之新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株被證實具有更佳之降低膽固醇能力。

本發明之第二方面是提供一種包含有至少一種依據本發明之新穎乳桿菌分離株或其繼代培養後代或由此等所衍生出的突變株以及一合適的賦形劑的組成物來供製備諸如飲料、糕點、嬰兒食品、發酵乳、營養補充品、動物飼料等之食用品。

本發明之第三方面是提供一種包含有一益生有效數量之至少一種依據本發明之新穎乳桿菌分離株或其繼代培養後代或由此等所衍生出的突變株的藥學組成物，來供用於治療與預防腸胃疾病以及降低血清膽固醇。

圖式之簡要說明

本發明之上述以及其他目的與特徵可藉由參照下文之描述、隨文檢附的申請專利範圍和伴隨之圖式而變得更為明顯，其中：

第1圖顯示本發明的新穎乳桿菌分離株與習知乳桿菌菌株在耐酸性上之比較，其中耐酸性以Δ log (a-b)來表示，a係為以生理鹽水(pH 7)處理2小時後的存活細胞數，而b為以生理鹽水(pH 2)處理2小時後的存活細胞數；

第2圖顯示本發明的新穎乳桿菌分離株與習知乳桿菌菌株在膽鹽耐受性上之比較，其中膽鹽耐受性以Δ log (c-d)來表示，c係為以MRS肉湯培養基(MRS broth)處理24小

時後的存活細胞數，而 d 為以加有 0.3%牛膽汁的 MRS 肉湯培養基處理 24 小時後的存活細胞數；

第 3 圖顯示本發明的新穎乳桿菌分離株與習知乳桿菌菌株，在有加與未加 0.3%牛膽汁的 MRS 肉湯培養基內之生長比較；

第 4 圖顯示本發明為進行菌株降低膽固醇能力的試驗而參考 *S. Razin et al. (1980), Biochimica Biophysica Acta, 598:628-640* 所製備的磷脂醯膽鹼-膽固醇容積與膽固醇濃度之關係。

第 5 圖顯示本發明所分離出的一株乳桿菌物種 *Lactobacillus gasseri* B21T1 分離株的 16S rDNA 之核苷酸序列；

第 6 圖顯示本發明所分離出的一株乳桿菌物種 *Lactobacillus gasseri* B21T6 分離株的 16S rDNA 之核苷酸序列；

第 7 圖顯示本發明所分離出的一株乳桿菌物種 *Lactobacillus gasseri* C21T1 分離株的 16S rDNA 之核苷酸序列；

第 8 圖顯示本發明所分離出的一株乳桿菌物種 *Lactobacillus gasseri* X21B7 分離株的 16S rDNA 之核苷酸序列；

第 9 圖顯示本發明所分離出的一株乳桿菌物種 *Lactobacillus gasseri* B38T38 分離株的 16S rDNA 之核苷酸序列；以及

第10圖顯示本發明所分離出的一株嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) B6T7分離株與嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*)以及植物乳桿菌(*L. plantarum*)之間的16S rDNA核苷酸序列差異，其中“以加框標示者”是該B6T7分離株與嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*)之間的核苷酸差異位址處，而“以*標示者”是該B6T7分離株與植物乳桿菌(*L. plantarum*)之間的核苷酸差異位址處。

發明之詳細說明

為得到符合本土習性以確保能適應本國人之腸道環境的本土性乳桿菌，申請人以居住於台灣新竹地區的1至6歲健康嬰幼兒之糞便作為所欲菌株之篩選源，使用一系列以羅格莎瓊脂為主之選擇性培養基(Rogosa agar-based selective media)來篩選乳桿菌疑似菌株(suspected strains)，而從43個樣品中所得的828個分離株(isolates)中找到400株疑似菌株。此等疑似菌株被進一步測試是否具有於上述「發明之概要說明」一節內所言特性，亦即：

1. 對酸之安定性，
2. 對膽鹼之安定性，以及
3. 具有降低膽固醇之能力，

且將這些疑似菌株拿來與公開菌株就此等特性作比較，而篩選出6株符合所求之具良好能力的新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株。

所得到的6株分離株進一步使用API鑑定系統、微生物電腦鑑定系統(Micro-IS System)與16S rDNA序列分析等

來作菌株鑑定，而依據鑑定結果，這6株分離株分別被分類命名為 *Lactobacillus gasseri* B21T1、B21T6、C21T1、X21B7與B38T38，以及嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) B6T7，此等分離株已於西元2002年6月18日寄存於食品工業發展研究所(中華民國台灣省300新竹市食品路331號)，寄存編號分別為CCRC 910195、CCRC 910196、CCRC 910198、CCRC 910199、CCRC 910197以及CCRC 910194。此等菌株亦有依據布達佩斯條約之規定，於西元2002年6月21日被寄存於美國類型培養物收集中心(ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA)，寄存編號分別為PTA-4483、PTA-4484、PTA-4479、PTA-4480、PTA-4481以及PTA-4482。

基於上述之有利特性，依據本發明之新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株適用作為一種益生菌。例如，該等分離株可被配製於廣泛種類之可食性材料內，該等材料包括：流體乳品(牛奶、濃縮牛奶)，發酵乳品(優酪乳、酸乳、冷凍優格、乳酸菌發酵飲料)，奶粉，冰淇淋，乳酪，乾酪，豆奶與發酵豆奶，蔬果汁、果汁及運動飲料等飲料，甜點，糖果，嬰兒食品，食療產品，動物飼料，膳食補充品等。每種產品之含菌量可為每公克或每毫升有約10^6至10^9菌落形成單位(colony forming units, CFU)。

明顯地，熟習本項技藝者可明瞭，本發明之新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株可被當作食品添加成分，藉由習知方法於原料製備時添加，或是不參與發酵而於發酵製程之後添加，而被配製成任何適用之形式來供人類及非人類之

動物的吸收。更佳地，本發明之新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株可單獨地或與至少一種其他益生性生物共同配製於可食性材料內，該等其他益生性生物包括：乳桿菌屬物種，如嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*)、乳酸乳桿菌(*L. lactis*)、短乳桿菌(*L. brevis*)、乳酪乳桿菌(*L. casei*)、植物乳桿菌(*L. plantarum*)、唾液乳桿菌(*L. salivarius*)、雙歧乳桿菌(*L. bifidus*)、保加利亞乳桿菌(*L. bulgaricus*)、高加索乳桿菌(*L. causasicus*)以及鼠李糖乳桿菌(*L. rhamnosus)*；鏈球菌屬物種，如嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)、乳酸鏈球菌(*Streptococcus lactis*)；酵母菌，如念珠菌屬物種 *Candida Kefyr*、弗羅稜酵母菌(*Saccharomyces florentinus*)；或此等菌種之組合。

另有一種應用形式是將本發明之新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株本身或含有此菌株之上述產品予以製成冷凍乾燥粉末或噴霧乾燥粉末，而使每個產品中約含 10^8 至 10^9 以上的活性乳桿菌菌體。將此產品添加以酵母粉、醣類或其他填充劑，可再製成錠劑或膠囊形式，例如含有乳桿菌之消化整腸藥劑或者即溶沖泡食品以及供直接食用之菌體粉末。

另外，本發明亦預期將上述新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株單獨地或與其他活性組份共同使用作為控制非所欲腸道微生物在一哺乳動物之消化道內集生的藥物，以減輕該非所欲腸道微生物所造成的不適腸胃症狀。該組成物可被配製成溶液、乳劑、粉末、錠劑、膠囊或供用於口服投

藥的其他適合形式。

又，基於本發明之新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株所具有的降低膽固醇能力，本發明亦預期該等乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株被用於製備用以降低血清膽固醇的保健食品與非處方醫藥品之應用。

就以上所述，被預期落在本發明的技術概念範疇內的是，具有相同於本發明之新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株的菌學特徵之菌株，本發明之新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株的繼代培養後代(subcultured offspring)，或是由本發明之新穎乳桿菌(*Lactobacillus*)分離株所衍生出的突變株。

如此處所用者，"突變株"此術語意指一種所具遺傳組成相對於一參考菌株(reference strain)或親代菌株(parent strain)有至少一個核苷酸差異(例如，經由核苷酸的取代、插入或刪除所致)的菌株。除天然突變之外，本發明的突變株可藉由多種方法來生成。例如，此等突變株可藉由親代菌株的隨機突變生成(random mutagenesis)，例如藉由化學突變劑、轉位因子(transposon)或輻射照射，而被獲得。此外，本發明之突變株可包含一重組型核酸序列。舉例來說，一突變株可為一帶有一額外的核酸序列(例如一經轉形(transformed)、性狀引入(transduced)或他種方式而被插入至親代菌株之一細胞內的序列)之菌株。該額外的核酸序列可編碼一被通常地或有條件地表現之聚胜肽。另擇地，該額外的核酸序列可編碼一能改變細胞生理學之核酸序列，例如一反訊息(anti-sense)、一核酶(ribozyme)或其他核酸序

列。在另一例中，被插入的核酸是被插入至一內源性基因內，並改變(例如增強或破壞)該基因之功能。舉例而言，該被插入的核酸可為一種將該內源性基因去活化的剔除建構物(knockout construct)；或為一種會增加該內源性基因的轉錄作用之人工增強子(enhancer)或啟動子(promoter)。

本發明將就下面實施例來作進一步說明，但應瞭解的是，該等實施例僅為例示說明之用，而不應被解釋為本發明的實施之限制。

實施例1 乳桿菌分離株的分離與篩選 (Isolation and screening of *Lactobacillus* isolates)

材料與方法：

一、培養基及稀釋液：

1.篩選培養基：

(A) 蕃茄汁瓊脂(tomoto juice agar)培養基

酪蛋白之酵素水解物(casein enzymatic hydrolysate，Sigma, Louis, Mo, USA)	10 g
脫脂奶(skim milk)	10 g
蕃茄汁(tomato juice)	400 ml
瓊脂(agar)	12 g
蒸餾水(distilled water)	加至 1 L

(B) 羅格莎瓊脂(Rogosa agar)培養基

羅格莎瓊脂(Merck,Darmstadt, Germany)	74.5 g
蒸餾水	1 L

經微波加熱溶解後，待冷卻至 55℃，以醋酸調整 pH 值至 pH 5.5

(C) 乳桿菌選擇培養基(*Lactobacillus* selective medium, LBS)

羅格莎瓊脂	8.4 g
蕃茄汁	40 ml
蒸餾水	60 ml

經微波加熱溶解後，待冷卻至 55℃，以醋酸調整 pH 值

至 pH 5.5

(D)Rogosa + X-glu 瓊脂培養基

將 80 mg 的 5-溴-4-氯-3-吲哚基 1-β-D-吡喃葡糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside, X-glu)(Sigma, Louis, MO, USA)加入至 100 ml 的 0.2 M Tris 緩衝液(pH 8.5)中，利用超音波振盪溶解之。將 10 ml 所形成的溶液加入至 190 ml 的 55℃ 羅格莎瓊脂中，即成為含 X-glu 最終濃度為 40μg /mL 之 Rogosa + X-glu 瓊脂。

2.菌種活化培養基(bacterial activation medium)：

(A)Bacto 乳桿菌 MRS 肉湯培養基(Bacto *Lactobacilli* MRS broth, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)

(B)MRS 瓊脂：Bacto 乳桿菌 MRS 肉湯培養基再添加細菌瓊脂(Agar bacteriological)(Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain, 歐盟製造的)(15g/L)。

3.核糖利用性培養基(ribose utilization medium)：

基礎培養基(basal medium)之組成：

Bacto 䏡腖 3 號(Bacto proteose peptone no.3)	10 g
Bacto 酵母萃取物(Bacto yeast extract)	5 g
(上述兩種組份之製造商為 Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)	
Tween 80	1 g
檸檬酸氫銨(ammonium hydrogen citrate)	2 g
乙酸鈉(sodium acetate)	5 g
硫酸鎂(magnesium sulfate)	0.1 g
硫酸錳(manganese sulfate)	0.05 g
磷酸氫二鉀(dipotassium (hydrogen) phosphate)	2 g
氯酚紅(chlorophenol red)	0.05%
蒸餾水	1 L

利用 HCl 將 pH 值調整至 pH 6.3

將配好的基礎培養基分裝至試管中，每管含 4.5 ml，

經 121℃滅菌 15 分鐘後，再加入 0.5 ml 經過濾滅菌後的 10%核糖(ribose)溶液。

三、 稀釋液(diluent)

四、 1%的腖水(peptone water)

(BACTO™ Peptone, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)

二、分離及篩選菌株的操作程序：

2. 取 1 至 6 歲幼兒之糞便中段，以長竹籤取出約一小截指頭大小之樣品，並將之加入至一內含 9 ml 稀釋液(0.1%腖水)之試管中，而製成一經 10 倍稀釋的檢液，將之充分均勻攪拌後靜置數分鐘，以使樣品中所含微生物被釋放至稀釋液中；
3. 取出 1 ml 的上述稀釋檢液，並將之置入至另一支內含 9 ml 稀釋液之試管中，依此重覆進行系列稀釋(serial dilution)直至達成 10^4-倍稀釋。
4. 就上述步驟 2 中所為之系列稀釋，分別取出 0.2 ml 之經 10^2-、10^3-、10^4-倍稀釋的檢液，並將之置於各種篩選培養基(羅格莎瓊脂、蕃茄汁瓊脂、乳桿菌選擇培養基以及 Rogosa + X-glu 瓊脂)上，以一 L 型玻棒予以塗抹均勻後，將該等篩選培養基置於一設定在 37℃之溫度下的厭氧培養箱(內含混和氣體：5% H_2、10% CO_2 與 85% N_2)內進行培養 2 至 4 天；
5. 挑選在 Rogosa + X-glu 瓊脂上呈現藍色且經顯微鏡檢查(microscopic examination)為無移動性(non-mobile)之桿菌菌落，或是在其他篩選培養基上外觀為半透明且經

顯微鏡檢查亦為無移動性之桿菌菌落，以竹籤挑菌並將之置入一含有MRS肉湯培養基以及一發酵內管之試管中，於37℃下予以培養1至2天後，收集有生長但不會產生氣體且經革蘭氏染色(Gram staining)顯示為陽性之菌株。

6. 就上述步驟4所收集到的菌株，以MRS肉湯培養基予以活化兩次後，依下面所述來進行生長溫度及核糖利用性試驗：
   (i) 將1%接種物接種至一MRS肉湯培養基內，並將該培養基置於15℃下靜置培養歷時14天，若有菌體生長，則表示該菌株可以於15℃生長，而若於第14天仍無菌體生長，則表示該菌株無法於15℃下生長；
   (ii) 將1%接種物接種至一MRS肉湯培養基內，並將該培養基置於45℃下靜置培養歷時2天，若有菌體生長，則表示該菌株可以於45℃生長，而若無菌體生長，則表示該菌株無法於45℃下生長；
   (iii) 將1%接種物接種至一於核糖利用性培養基，並於37℃下靜置培養數天，若培養液由紫變黃，表示菌體可以利用核糖生長並產酸；若7天後培養液仍為紫色，再繼續靜置培養，若第14天培養液仍未變成黃色，則表示此菌株無法利用核糖生長並產酸。

三、結果：

在此實施例中，有關乳桿菌(*Lactobacillus*)的篩菌培養

基主要以羅格莎瓊脂為基礎，有的則再添加以番茄汁或X-glc。番茄汁含豐富維他命B群，而有利於乳桿菌(*Lactobacillus*)的生長，而羅格莎瓊脂中的醋酸除了降低pH值以抑菌外，高濃度的醋酸根離子同時也有抑制微生物生長的效果。

嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)生長在羅格莎瓊脂上的外觀是呈現白色菌落，而不易與其他的乳桿菌(*Lactobacillus*)分辨。若於羅格莎瓊脂中添加X-glc，嗜酸乳桿菌菌落(*Lactobacillus acidophilus*)的外觀即會變成藍色，這是因為嗜酸乳桿菌具有β-D-糖苷酶(β-D-glucosidase)活性而會打斷X-glc之β-D-糖苷鍵(β-D-glucosidic bond)，而產生藍色的發光團(chromogene)，進而使嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)菌落呈現藍色。但是，於細胞中擁有此酵素的微生物並不在少數，故仍須作進一步鏡檢、革蘭氏染色及進行上述的醣類與生長溫度等生理生化的試驗，再挑出具有所欲性質之疑似菌株(suspected strains)。

申請人從居住於台灣新竹市地區的1至6歲健康嬰幼兒之糞便共收集了43個樣品，每個樣品經稀釋後塗抹於各選擇性培養基中，菌株長出後，再從選擇性培養基中挑出顏色與型態不同的菌落進行鏡檢，若鏡檢結果為桿菌，再進行革蘭氏染色，挑選出革蘭氏陽性的桿菌，並將之稱為分離株(isolates)。此等分離株被置於含發酵內管之MRS肉湯培養基中，再從中挑選出不會產生氣體之菌株來進行生

長溫度與核糖利用性試驗。若測試的菌株能在45℃下生長但不能在15℃下生長，且不能利用核糖作為生長所需碳源的菌株則進行保存，於此階段所收集的菌株被稱之為疑似菌株。

參見表1，申請人在所收集的43個樣品中總計挑選出828株分離株，其中有400株疑似菌株。關於菌株之編號方式，舉B6T7為例，B是指培養基種類(LBS)，6是指樣品來源標號，T是指菌株顏色(外觀透明)，而7是指菌落之流水標號。

表1. 收集的樣品*標號及其分離菌數

樣品標號	分離菌數	疑似菌株	樣品標號	分離菌數	疑似菌株
1	40	0	23	3	0
2	0	0	24	0	0
3	0	0	25	100	100
4	26	0	26	0	0
5	45	0	27	0	0
6**	68	55	28	0	0
7	0	0	29	0	0
8	0	0	30	60	0
9	0	0	31	0	0
10	0	0	32	0	0
11	0	0	33	0	0
12	60	60	34	0	0
13	0	0	35	0	0
14	0	0	36	139	115
15	0	0	37	0	0
16	0	0	38**	120	40
17	0	0	39	0	0
18	0	0	40	0	0
19	0	0	42	60	0
20	14	0	42	0	0
21**	30	30	43	60	0
22	3	0	**總數**	**823**	**400**

*：樣品來源：台灣新竹市之1至6歲幼兒的糞便

**：本發明分離株的樣品來源編號

該等疑似菌株接而進行下面實施例所描述的耐酸性、膽鹽耐受性試驗及降低膽固醇能力試驗，其中6株經試驗而顯示具有良好特性之分離株，即B21T1、B21T6、C21T1、X21B7、B38T38與B6T7，被拿來下列習知的菌株進行此等性質之比較：

1. 嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) CCRC 17064 (對應於 ATCC 43121，分離來源為豬)，此菌為具降低血清膽固醇能力之乳桿菌(S.E. Gilliland *et al.* (1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 377-381; S.E. Gilliland and D.K. Walker (1990), *J. Dairy Sci.*, 73:905-911; F.A.M. Kalver and R. van der Meer (1993), *Appl. Environ. Microbiol,* 59: 1120-1124; D.O. Noh *et al.* (1997), *J. Dairy Sci.*, 82: 3107-3113)；
2. 嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) CCRC 10695^{T} (對應於 ATCC 4356，分離來源為人類)，此菌為來自人體之嗜酸乳桿菌標準株(D.K. Walker and S.E. Gilliland (1993), *J. Dairy Sci.*, 76:956-961)，
3. 嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) DDS-1 (分離來源為人類)，此菌為一目前市面有售之產品(Nebraska Cultures, Inc.)；
4. 嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) CCRC 14065 [對應於 CSCO 2401，商業上可獲自於 Commonwealth Scientific Industrial Research Organization (CSIRO), Canberra, Austrilia]；以及

5. 一種乳桿菌物種之寄存物 *Lactobacillus gasseri* CCRC 14619^{T}（對應於 ATCC 33323，分離來源為人類）(*Int. J. Syst. Bacteriol. (1980), 30, 601; E. Lauer and O. Kandler, Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe C, 1980, 1, 75-78*)。

實施例 2 耐酸性試驗(acid tolerance test)

一、實驗操作程序：

參考 J.E. Holcombe *et al.* (1991), *Cult. Dairy Prod. J.*, 26(3):4-5 以及發證予 Y.S. Yang 等人之 US 5,711,977 中所揭示的方法，以中性(pH 7)及仿胃酸環境(pH 2)中來作存活菌數之測試。

各試驗菌株以 MRS 肉湯培養基活化兩次後，取其菌液離心(3,000 rpm，10 分鐘)，去除上清液後，添加 1 ml 的生理食鹽水溶液(0.85% NaCl, pH 7)，先以竹籤將菌體攪散，再振盪均勻，然後分別取 0.5 ml 經散浮的菌液置於 pH 7 及 pH 2 的生理食鹽水溶液中，於一為 37℃ 的恆溫培養箱內靜置 2 小時後，分別測其存活菌數。Δ log 菌數[= log(在 pH 7 下之菌數－在 pH 2 下之菌數)]之數值越小，視為耐酸性較佳之菌株。

二、結果：

大部分的微生物在酸性環境中均無耐受性。乳酸菌本身雖為一產酸菌，但其生長環境僅能達 pH 3.2 至 4.5，因此，在胃中極低 pH 之環境(pH 2.0 至 3.2)亦為影響其存活之主要因素。胃酸 pH 值會隨胃內容物之進入時間及種類

而有 pH 1.5～4.5 之不同，平均歷時 2 小時，故試驗時採用 pH 2 作為代表，且因酸性物質與鹽酸相似，故以經鹽酸調整 pH 值為 2 之生理食鹽水(0.85% NaCl/0.01 N HCl 系統)，於 37℃ 下處理 2 小時後測試存活的菌數，並與 pH 7 之對照組作比較。

試驗結果顯示，經不同 pH 值、37℃/2h 處理後，以嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) CCRC 17064 耐酸性為最佳(第 1 圖)，接受處理的菌數只降低 1.9 個 log 值，而嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) CCRC 10695^{T} 與 *Lactobacillus gasseri* CCRC 14619^{T} 的耐酸性較差，菌數分別降低 4.3 及 4.4 個 log 值。

本發明於實施例 1 所得到的新分離株 B21T1 (後經菌學特徵鑑定被分類為 *Lactobacillus gasseri*，如下面實施例所示)與 CCRC 14065 的耐酸性相近，菌數降低了 3.9 個 log 值。本發明之另外 5 個分離株(B21T6、C21T1、X21B7、B38T38 與 B6T7)的耐酸性相近，且皆達到 Δ log 菌數小於 4 之耐酸性篩選指標(參見 Y.S. Yang 等人之 US 5,711,977)。

實施例 3. 膽鹽耐受性試驗(bile salt tolerance test)

一、實驗操作程序：

各試驗菌株以 MRS 肉湯培養基活化兩次後，再分別取 1%接種物接種於 10 ml MRS 肉湯培養基以及 10mL 含 0.3% 牛膽汁之 MRS 肉湯培養基(MRSO)中，於 37℃ 予以培養 24 小時後，以分光光度計分別測定菌體濃度(OD_{660})。另外，亦計數其殘存菌數，其中 Δ log 菌數值＝log (MRS 肉湯培養

基之菌數−MRSO 肉湯培養基之菌數)，而 Δlog 菌數值越小，表示試驗菌株的膽鹽耐受性越佳。

二、結果：

乳酸菌經膽鹽處理後，不同菌種間之存活率有很大差異，因此，篩選具有膽鹽耐受性之乳酸菌株在選用益生菌上有其重要性(S.E. Gilliland *et al.*(1984), *J. Dairy Sci.*, 67:3045-3051; P. Marteau *et al.* (1997), *J. Dairy Sci.*, 80:1031-1037)。於先前之研究中，牛膽汁被普遍使用於培養基中來供選擇性培養人類腸內菌，因此其效力應很類似於人類膽鹽且平均濃度為 0.3%(w/v)(S.E. Gilliland and D.K. Walker (1990), *J. Dairy Sci.*, 73:905-911; D.K. Walker and S.E. Gilliland (1993), *J. Dairy Sci.*, 76:956-961)。

試驗結果顯示，除 CCRC 10695^T、CCRC 14619^T、CCRC 14065 外，各試驗菌株不論在含有或不含 0.3%牛膽汁的培養基中，所測得的 OD_{660} 值(菌體濃度)皆在 2 以上(表 2)，這顯示 0.3%牛膽汁對於試驗菌株的生長，似乎影響不大。

表 2. 試驗菌株培養物在含有或不含 0.3%牛膽汁之 MRS 肉湯培養基內培養 24 小時之生長比較

培養物	菌體濃度(OD_{660} 值)	
	MRS 肉湯培養基	MRS 肉湯培養基＋0.3%牛膽汁
B6T7	2.49	2.74
C21T1	2.44	2.56
B38T38	2.45	2.03
B21T1	2.57	2.53
B21T6	2.62	2.29
X21B7	2.69	2.50
CCRC 17064	2.91	2.37
CCRC 10695^T	2.35	1.09
CCRC 14065	2.55	1.79
CCRC 14619^T	2.96	1.58
DDS-1	2.87	2.72

但是，亦注意到本發明的 B6T7 及 C21T1 這兩個菌株在 MRSO 肉湯培養基之菌體濃度高於 MRS 肉湯培養基，這顯示可能有其他干擾因子形成而影響到吸光。因此，進一步觀察試驗菌株在兩組培養基內培養 24 小時後的存活菌數。

參見第 2 圖，由觀察到的菌數降低可知，CCRC 14619^T 的膽鹽耐受性較差，其次為 CCRC 10695^T 以及本發明的 B38T38 菌株。而膽鹽耐受性最佳者為本發明的分離株 B6T7，其餘各菌株的膽鹽耐受性相近，即於含 0.3%牛膽汁之 MRS 肉湯培養基中培養 24 小時後，其死滅菌數皆在 1 至 2 個 log 值內。

另外，觀察部分菌株在含 0.3%牛膽汁之 MRS 肉湯培養基中的生長曲線，以生長曲線斜率代表生長速率，斜率越大，表示生長速率越快，即膽鹽耐受性較佳。由第 3 圖可知，CCRC 17064 之生長速率最快，其次為本發明的分離株 X21B7 與 B21T1，而 CCRC 14065、CCRC 10695^T 及 DDS-1 的生長最慢。

雖然由不同觀測方式所得之結果略有小差異，由這些試驗可知，本發明所篩選出的乳桿菌皆具有耐酸性及膽鹽耐受性。

實施例 4. 菌株降低膽固醇能力之分析

一、實驗操作程序：

(A) 膽固醇來源

關於菌株降低膽固醇能力之測試，習知文獻與已公開的專利前案所用的膽固醇來源大多採用 PPLO (BACT PPLO SERUM FRACTION)，但此產品目前已停止生產，因此，於本實施例中，申請人參考 Huang, C. and T.E. Thomopson (1974), *Methods Enzymol.* 32:485-489 以及 S. Razin *et al.* (1980) *Biochimica Biophysica Acta,* 598:628-640 中所揭示的磷脂醯膽鹼-膽固醇製備方法，採用馬血清及磷脂醯膽鹼-膽固醇作為膽固醇來源，而製備出一均勻分佈的磷脂醯膽鹼-膽固醇溶液，其容積與所含膽固醇濃度呈一正相關曲線關係(第 4 圖)。

1.馬血清(Horse serum)

將馬血清溶於水中，以一孔徑為 0.45 μm 的過濾膜予

以過濾後，將之存放於-20℃冰箱中。

2.磷脂醯膽鹼-膽固醇[蛋卵磷脂(Egg Lecithin)＋膽固醇]

依據 S. Razin *et al.* (1980), *Biochimica Biophysica Acta,* 598:628-640，將蛋卵磷脂及膽固醇加入至一旋轉真空濃縮儀(Rotary vacuum evaporator, EYELA)之磨砂塞瓶中，以足量之氯仿將其均勻溶解，再以氮氣吹乾，以使膽固醇與蛋卵磷脂均勻混合並在磨砂塞瓶內之玻璃壁上形成一均勻薄膜，繼之以 0.4 M 蔗糖溶液予以覆溶(re-dissolved)，將氮氣吹入至該磨砂塞瓶內並封上瓶蓋，再以鋁箔(aluminum foil)包覆，俾以降低脂質氧化之機率。

在 4℃下以水浴式超音波震盪器震盪該經密封之磨砂塞瓶歷時 15 分鐘後，將上述混合溶液加壓通過具一孔徑為 0.22 μm 的過濾膜 2 次，隨即將之保存於 4℃冰箱內(須於 3 天內使用)。

(B) 試驗組別

試驗(1)：試驗菌株以 MRS 肉湯培養基予以活化兩次後，取 1%接種物接種於 10 ml MRSS (內含 8.8 ml MRS 以及 1.2 ml 膽固醇溶液與 0.3%牛膽汁)中，並於一為 37℃之厭氧培養箱(10% CO_2 及 90% N_2)內進行培養歷時 24 小時，然後依下面(C)項中所述，收集接種有試驗菌株之培養物的上清液樣品以及細胞沉澱丸樣品來供膽固醇含量測定之用。

試驗(2)：菌株以 MRS 肉湯培養基活化兩次後，取 1%接種物接種於 10 mL MRSO 中，在 37℃下予以培養歷時 20

至 22 小時，再取出 1%接種物接種於 10 mL MRSS 中，並於一為 37℃之厭氧培養箱(10% CO_2 及 90% N_2)內進行培養歷時 24 小時，然後依下面(C)項中所述，收集接種有試驗菌株之培養物的上清液樣品以及細胞沉澱丸樣品來供膽固醇含量測定之用。

(C) 膽固醇含量之測定

膽固醇含量之測定係依據 *o*-苯二甲醛(*o*-phthalaldehyde)方法來進行(L.L. Rudel and M.D. Morris (1973), *Notes on Methodology,* 14:364-366; S.E. Gilliland *et al.* (1985), *Appl. Environ. Microbiol,* 49: 377-381)。

就上述試驗(1)與試驗(2)，各取 1 ml 的測試菌液，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘後，將 0.5 ml 上清液置於一試管中，此即為接種有試菌株之培養物的上清液樣品。

就上述試驗(1)與試驗(2)，各取 1 ml 的測試菌液，以 3,000 rpm 離心 10 分鐘後，除去上清液，所形成的細胞沉澱丸(cell-pellet)以 10 ml MRSO 肉湯培養基覆溶(redissolve)並混合均勻後，取出 0.5 ml 溶液置於一試管中，此即為接種有試驗菌株之培養物的細胞沈澱丸樣品。

各測試樣品予以加入 3 ml 的 95%乙醇並振盪均勻，再加入 2 ml 50% KOH 振盪均勻，接而於 60℃水浴下加熱 10 分鐘，再置於室溫下冷卻。經冷卻的溶液予以加入 5 ml 己烷(hexane)並振盪均勻，再加入 3ml 的 H_2O。所形成的混合物在振盪均勻後於室溫下靜置 15 分鐘，取出 2.7 ml 的己烷層並移到另一試管內，於 60℃下利用氮氣將己烷蒸

發。蒸發後的固體被加入 4 ml 的 *o*-苯二甲醛試劑溶液(*o*-phthalaldehyde reagent, 0.5 mg *o*-苯二甲醛/1 ml 乙酸)，振盪均勻後靜置於室溫下歷時 10 分鐘，再加入 2 ml 濃硫酸，振盪均勻後靜置於室溫下歷時 10 分鐘，再以分光光度計來測定 OD_{550} 值。

(D) 菌株降低膽固醇能力之評估

依據下列公式來評估菌株降低膽固醇的能力：

$$\mathbf{A = 100 - [(B/C)\times 100]}$$

A＝膽固醇之降低率(%)

B＝接種有試驗菌株之培養物的上清液樣品內之膽固醇含量(mg)

C＝未接種有試驗菌株之培養物的上清液樣品內之膽固醇含量(對照組)

若 A 值達 80%以上，即視為具有明顯之降膽固醇能力。

(E) 試驗菌株的膽固醇同化作用之評估

$$\mathbf{A'=100 -[(B' + C')\times 100]}$$

A'＝膽固醇之同化作用(%)

B'＝接種有試驗菌株之培養物的上清液樣品內之膽固醇含量(%)

C'＝接種有試驗菌株之培養物的細胞沉澱丸樣品內之膽固醇含量(%)

若 A'值達 15%以上，即視為具明顯之膽固醇同化能力。

二、結果：

I、菌株降低膽固醇的能力

比較試驗(1)(亦即在 MRS 肉湯培養基內之生長)與試驗(2)(亦即在 MRSO 肉湯培養基內之生長)，兩者間之差別在於試驗(2)中的試驗菌株有先被接種至 MRSO 肉湯培養基內培養 20 至 22 小時，再取 1%接種物予以接種至 10 ml MRSS 中，此用意係在於再一次篩選菌株是否有好的膽鹽耐性，同時也可篩選具有降膽固醇能力之菌株。

以馬血清作為膽固醇來源之試驗結果顯示(表 3)，習知的嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) CCRC 17064 以及 DDS-1，在此試驗同樣也有明顯效果，降低膽固醇能力達 88 至 98%。而 CCRC 14065、CCRC 10695^T 與 CCRC 14619^T 的降膽固醇能力則不明顯，這可能是因為此等菌株的膽鹽耐性較差，在 MRSO 肉湯培養基內的生長差，以致所觀察到的降低膽固醇能力僅達 30 至 43%。

而本發明所得的分離株 B6T7、C21T1、B21T1、B21T6、B38T38 及 X21B7 在兩組試驗中，降低膽固醇的能力皆達 91 至 99%以上，略高於 CCRC 17064 及 DDS-1 所具者，而顯示出本發明所篩選之菌株亦具有良好的降低血清膽固醇的能力。

表 3. 試驗菌株降低膽固醇(馬血清模型)[a]能力之評估

培養物	於 MRS 肉湯培養基[b]內之生長		於 MRSO 肉湯培養基[c]內之生長	
	膽固醇[d] (μg/ml)	膽固醇降低率 (%)	膽固醇[d] (μg/ml)	膽固醇降低率 (%)
B6T7	6.71	92.2	7.14	92.7
C21T1	0.69	99.2	2.41	97.2
B38T38	2.24	97.4	7.57	91.2
B21T1	3.10	96.6	0.34	99.6
B21T6	2.84	96.7	2.24	97.4
X21B7	1.34	98.4	3.27	96.2
CCRC 17064	1.12	98.7	9.81	88.4
CCRC 10695	8.00	90.7	56.97	33.8
CCRC 14065	11.70	86.4	59.90	30.4
CCRC 14619	2.84	96.7	49.14	42.9
DDS-1	5.94	93.1	5.16	94.0
Control	86.06	—	86.06	—

[a]: 補充有 0.3%牛膽汁與 12%馬血清的 MRS 肉湯培養基.

[b]: 在試驗前，所有培養物使用 1%接種物被繼代培養(subcultured)於 MRS 肉湯培養基內，並於 37℃下被培育歷時 24 小時.

[c]: 在試驗前，所有培養物使用 1%接種物被次-培養於 MRSO 肉湯培養基(MRS 肉湯培養基加上 0.3%牛膽汁)內，並於 37℃下被培育歷時 24 小時.

[d]: 肉湯培養基內的初始膽固醇含量為 86.06 μg/ml.

參見表 4，比較馬血清試驗中具有降低膽固醇能力的菌株，改以磷脂醯膽鹼-膽固醇作為膽固醇來源時，發現到各菌株的膽固醇降低率(%)有下降趨勢，這顯示乳桿菌(*Lactobacillus*)菌株對於不同型態的膽固醇的降低能力會有變化，其中 CCRC 17064 對於磷脂醯膽鹼-膽固醇的降低率為 11 至 29%，而本發明所得到的菌株對於磷脂醯膽鹼-膽固醇的降低率為 23 至 48%，顯然要比 CCRC 17064 為高，但略低於 DDS-1 所具之 50%。

表 4. 試驗菌株降低膽固醇(磷脂醯膽鹼-膽固醇模型)[a] 能力之評估

培養物	於 MRS 肉湯培養基[b]內之生長		於 MRSO 肉湯培養基[c]內之生長	
	膽固醇[d] (μg/ml)	膽固醇降低率 (%)	膽固醇[d] (μg/ml)	膽固醇降低率 (%)
B6T7	45.05	23.92	33.70	43.10
C21T1	30.71	48.15	43.59	26.40
B38T38	33.75	43.01	35.16	40.62
B21T1	32.34	45.39	32.83	44.57
B21T6	35.43	40.16	36.25	38.79
X21B7	35.11	40.71	39.29	33.65
CCRC 17064	52.66	11.07	42.01	29.06
DDS-1	29.24	50.63	29.46	50.26
Control	59.22	—	59.22	—

[a]: 補充有 0.3%牛膽汁與 12%磷脂醯膽鹼-膽固醇的 MRS 肉湯培養基.

[b]: 在試驗前，所有培養物使用 1%接種物被繼代培養(subcultured)於 MRS 肉湯培養基內，並於 37℃下被培育歷時 24 小時.

[c]: 在試驗前，所有培養物使用 1%接種物被次-培養於 MRSO 肉湯培養基(MRS 肉湯培養基加上 0.3%牛膽汁)內，並於 37℃下被培育歷時 24 小時.

[d]: 肉湯培養基內的初始膽固醇含量為 59.22 μg/ml.

II、試驗菌株對膽固醇的同化作用

有關乳酸菌降低膽固醇的機制，主要是利用膽固醇和去結合的膽鹽(deconjugated bile salt)產生共沈澱作用而將膽固醇排除(F.A.M. Kalver 和 R. van der Meer (1993)，同前述；M.M. Brashears 和 S.E. Gililland (1997)，同前述)，以及菌株本身對膽固醇的同化作用(Gilliland et al. (1985)，同前述；D.O. Noh *et al.* (1997)；同前述；以及張和駱等人(1998)，同前述)。

參見表 5 所示，可看出 CCRC 17064、本發明所得到的 6 個分離株以及 DDS-1 對膽固醇皆具有同化作用，但不同菌株對於膽固醇的同化能力略有差異，所觀察到的同化率約在 11 至 40%左右。而 CCRC 14065 及 CCRC 10695^{T} 及 CCRC 14619^{T} 的膽固醇同化能力則不明顯。

表 5. 試驗菌株的膽固醇[a]同化率之評估

Cultures	MRS 肉湯培養基[b]內之生長			於 MRSO 肉湯培養基[c]內之生長		
	用過的肉湯培養基內之膽固醇[d] (%)	細胞沉澱丸內之膽固醇 (%)	被同化的膽固醇 (%)	用過的肉湯培養基內之膽固醇[d] (%)	細胞沉澱丸內之膽固醇 (%)	被同化的膽固醇 (%)
B6T7	7.8	51.4	40.8	7.3	74.1	18.6
C21T1	0.8	86.0	13.2	2.8	72.3	24.9
B38T38	2.6	79.1	18.3	8.8	83.7	7.5
B21T1	3.4	81.7	14.9	0.4	88.4	11.2
B21T6	3.3	67.2	29.5	2.6	81.4	16.0
X21B7	1.6	67.0	31.4	3.8	71.3	24.9
CCRC 17064	1.3	68.5	30.2	11.6	72.9	15.5
CCRC 10695	9.3	71.7	19.0	66.2	33.4	0.4
CCRC 14065	13.6	82.0	4.4	69.6	27.8	2.6
CCRC 14619	3.3	80.6	16.1	57.1	42.7	0.2
DDS-1	6.9	78.5	14.6	6.0	81.3	11.2

[a]: 補充有 0.3%牛膽汁與 12%馬血清的 MRS 肉湯培養基.

[b]: 在試驗前，所有培養物使用 1%接種物被繼代培養(subcultured)於 MRS 肉湯培養基內，並於 37℃ 下被培育歷時 24 小時.

[c]: 在試驗前，所有培養物使用 1%接種物被次-培養於 MRSO 肉湯培養基(MRS 肉湯培養基加上 0.3%牛膽汁)內，並於 37℃ 下被培育歷時 24 小時.

[d]: 對照組內的膽固醇濃度被界定為 100 份.

綜合以上試驗結果，本發明所篩選出之 6 株本土性乳桿菌分離株被顯示具有良好耐酸、耐膽鹽及降膽固醇能力之特性。於下進一步進行此等分離株的菌學特徵鑑定。

實施例 5. 乳桿菌分離株的特徵鑑定(Identification and characterization of *Lactobacillus* isolates)

一、實驗操作程序

(1) 初步試驗

將新鮮培養(18 至 24 小時)之菌株進行初步鑑定，試驗項目包括：革蘭氏染色(Gram staining)、形態觀察(morphological observations)、過氧化氫酶反應、運動性(motility)、在好氧(aerobic)與厭氧(anaerobic)條件下之生長情形等試驗(O. Kandler and N. Weiss (1986), Regular, nonsporing Gram-positive rods and Cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Hotl, J. G., ed.) Vol. II. pp. 1208-1234. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA)。

(2) API 鑑定系統

此鑑定試驗係依據 G. H. Fleet *et al.* (1984), *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1034-1038，而乳酸菌鑑定係使用 API 50 CHL 套組(法國 API BioMerieux Research laboratory, La Balme Les Grottes, Montalien, Jeraeh, France)，所用之測試項目為：甘油、赤蘚糖醇(erythritol)、D-阿拉伯糖(D-arabinose)、L-阿拉伯糖(L-arabinose)、核糖、D-木糖(D-xylose)、L-木糖(L-xylose)、核糖醇(adonitol)、β-甲基-木糖苷(β-methyl-xyloside)、半乳糖(galactose)、D-葡萄糖、D-果糖(D-fructose)、D-甘露糖(D-mannose)、L-山梨糖(L-sorbose)、鼠李糖(rhamnose)、衛矛醇(dulcitol)、肌醇(inositol)、甘露糖醇(mannitol)、山梨糖醇(sorbitol)、α-甲基-D-甘露糖苷(α-methyl-D-mannoside)、α-甲基-D-葡萄糖苷(α-methyl-D-glucoside)、N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl glucosamine)、苦杏仁苷(amygdalin)、熊果甘(arbutine)、七葉甘(esculin)、水楊甘(salicin)、纖維二糖(cellobiose)、麥芽糖(maltose)、乳糖(lactose)、木蜜二糖(melibiose)、蔗糖(saccharose)、海藻糖(trehalose)、菊糖(inuline)、落葉松糖(melezitose)、D-植物蜜糖(D-raffinose)、澱粉(amidon)、肝糖(glycogen)、木糖醇(xylitol)、β-龍膽二糖(β

-gentiobiose)、D-松二糖(D-turanose)、D-來蘇糖(D-lyxose)、D-塔格糖(D-tagatose)、D-炭藻糖(D-fucose)、L-炭藻糖(L-fucose)、D-阿拉伯膠醇(D-arabitol)、L-阿拉伯膠醇(L-arabitol)、葡萄糖酸(gluconate)、2-酮-葡萄糖酸(2-keto-gluconate)、5-酮-葡萄糖酸(5-keto-gluconate)等 49 種碳源之產酸試驗。

此系統之操作程序為：以無菌棉棒沾取平板上之菌落，將之均勻懸浮於 2ml 之 0.85%生理食鹽水中，以滅菌過之滴管吸取懸浮菌液，置 n 滴於另一 5ml 之 0.85%無菌生理食鹽水中，使其濃度與 McFarland No. 2 (由 9.8 ml 的 1% H_2SO_4 與 0.2 ml 的 1% $BaCl_2$ 所構成的混合溶液)之標準液濃度相當。此時另取懸浮菌液，置 2n 滴於 API 50 CHL 培養液之玻璃管中，予以混合均勻後，分別加入適當體積至每個測試條之孔洞(tubes of the strip)中，並加蓋礦物油，然後放入培養盒(incubation tray)中(盒內事先加水，俾於培養時培養液不被蒸乾)，加上蓋子(incubation lid)後置於 37℃下培養歷時 48 小時，之後取出判讀。將結果記錄下來，並與 API LAB Software 鑑定系統之資料庫(database)做比對，以鑑定出最適當之屬名與種名。

(3) 微生物電腦鑑定系統(Micro-IS System)

此鑑定試驗係依據 M. Rogosa *et al* (1971), Method for coding data on microbial strains for computers (edition AB), Int. J. Syst. Bacteriol. 21:1A-184A，利用 Micro-IS System 之 Matrix 5 [乳桿菌物種(*Lactobacillus sp.*)適用]，所用之測試項目包

括：運動性；溫度生長試驗(15℃、45℃)；好氧下生長；D-葡萄糖及葡萄糖酸產氣試驗，苦杏仁苷(amygdalin)、L-阿拉伯糖(L-arabinose)、纖維二糖(cellobiose)、D-果糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、乳糖、麥芽糖、D-甘露糖醇(D-mannitol)、D-甘露糖(D-mannose)、落葉松糖(melezitose)、木蜜二糖(melibiose)、鼠李糖(rhamnose)、L-鼠李糖(L-rhamnose)、D-核糖、水楊甘(salicin)、D-山梨糖醇(D-sorbitol)、蔗糖、海藻糖(trehalose)、D-木糖(D-xylose)等之產酸試驗，七葉甘(esculin)之水解以及精胺酸脫胺作用(L-arginine deamination)之生長試驗等。將各項試驗之正、負結果輸入 Micro-IS 電腦鑑定程式中，即可得到鑑定之屬名或種名。

(4) 16S rDNA 序列分析

此鑑定試驗係依據 Rosenblum *et al.* (1997), *Nucleic Acid Res.*, 25: 4500-4504，將新鮮的菌體刮取少許放入 1.5 ml 微量離心管中，以蛋白酶 K (proteinase K)及核酸核糖酶(RNase)處理後，利用自旋管柱(spin column)取得基因群 DNA (genomic DNA)後，進行聚合酶鏈反應擴增(PCR amplification)，接而純化之。PCR 擴增後的產物經電泳確認後，以 MicroSeq™ 16SrDNA Gene Kit (PE Co., USA)進行反應，接而利用 ABI Prism 310 Genetic Analyzer 進行 DNA 序列分析，再將所得的 12 條 DNA 序列以 MicroSeq™軟體(PE Co., USA)來進行分析、整合，可得約 1500bp 之 16S rDNA 序列，然後再與 DNA 資料庫(MicroSeq™ Reference Manual, 1999, PE CO., USA)進行比對分析。

二、結果

1. 本發明之分離株 **B21T1**

(i) 依初步試驗決果，此分離株為革蘭氏陽性桿菌，不具過氧化氫酶，無可動性(non-mobile)，於好氧及厭氧條件下均可生長；

(ii) 利用 API System 之 API 50 CHL 鑑定套組，所得之測試結果如表 **6** 所示，鑑定分數為 91.0 (%ID)，鑑定結果為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)；

(iii) 以微生物電腦鑑定系統(Micro-IS System)進行本案分離株 B21T1 之鑑定，所得結果如表 **7** 所示，鑑定菌名為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)，鑑定分數達 0.682 (ID 計分)；

(iv) 本案分離株 B21T1 之 16S rDNA 序列分析結果如第 5 圖所示，將所得序列與 DNA 資料庫(MicroSeq™ Reference Manual, 1999, PE CO., USA)進行比對，發現本案分離株 B21T1 之 16S rDNA 序列(SEQ ID NO:1)與 *Lactobacillus gasseri* [為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)族群中的 B_1 群]之 16S rDNA 序列相似度最高(G. Klein *et al.* (1998), *International Jourmal of Food Microbiology.* 41:103-125)；

表 6

菌株編號：B21T1
鑑定效果之描述：可疑的結果

測試條：API 50 CHL
結果(profile)：---------- -+-+?----- --++-++++- -+-------+ ----------
50 種醣類反應結果

0	–	GLY	–	ERY	–	DARA	–	LARL	–	RIB	–	DXYL	–	LXYL	–	ADO	–	MDX	–	GAL	–
GLU	+	FRU	–	MNE	+	SBE	?	RHA	–	DUL	–	INO	–	MAN	–	SOR	–	MDM	–	MDG	–
NAG	+	AMY	+	ARB	–	ESC	+	SAL	+	CEL	+	MAL	+	LAC	–	MEL	–	SAC	+	TRE	–
INU	–	MLZ	–	RAF	–	AMD	–	GLYG	–	XLT	–	GEN	+	TUR	–	LYX	–	TAG	–	DFUC	–
LFUC	–	DARL	–	LARL	–	GNT	–	2KG	–	5KG	–										

明顯的分類		% Id.	T	針對菌種的試驗
可能的菌株名				
嗜酸乳桿菌(*Lacto. acidophilus*)	1	91.0	0.53	3
下一個選擇				
一種乳桿菌物種 *Lacto. crispatus*	2	5.4	0.35	4

嗜酸乳桿菌(*Lacto. Acidophilus*) 1： 3 針對下列之試驗(註：若要確立為嗜酸乳桿菌所建議之部分醣類再測試)

半乳糖	(GAL)	75 %	D-果糖	(FRU)	100 %
海藻糖	(TRE)	77 %			

表 7

Micro-IS 系統
菌株名稱：B21T1、B21T6、C21T1、X21B7、B6T7

−	013001	運動性	−	006001	內孢子
−	017013	生長 15℃	+	017017	生長 45℃
+	016059	好氣性生長	−	024045	葡萄糖成為 CO_2
−	028528	葡萄糖酸，氣體	+	025203	苦杏仁苷，酸
−	025181	L-阿拉伯糖，酸	+	025211	纖維二糖，酸
+	025193	D-果糖，酸	+	025194	D-半乳糖，酸
+	025195	D-葡萄糖，酸	+	025212	乳糖，酸
+	025213	麥芽糖，酸	−	026371	D-甘露糖醇，酸
+	025196	D-甘露糖，酸	−	025217	落葉松糖，酸
+	025214	木蜜二糖，酸	+	025218	植物蜜糖，酸
−	025191	L-鼠李糖，酸	−	025184	D-核糖，酸
+	025210	水楊甘，酸	−	026374	D-山梨糖醇，酸
+	025215	蔗糖，酸	+	025216	海藻糖，酸
−	025186	D-木糖，酸	+	028060	L-蘋果酸利用性

檢驗	**ID 計分	**可能性	**最佳可能性.
1 嗜酸乳桿菌	0.68224	0.079110108	0.0791101
2 犢乳桿菌(*L. vitulinus*)	0.31761	0.036828671	0.1104860

建議再做的試驗	**成組的數值	**單獨的數值
1 024029 (L+) 乳酸生成		1

依上述之鑑定結果，本案之分離株 B21T1 最可能為嗜酸乳桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 族群中的 B_1 群 --*Lactobacillus gasseri*。

2. 本發明之分離株 **B21T6**

(i) 依初步試驗決果，此分離株為革蘭氏陽性桿菌，不具過氧化氫酶，無可動性，在好氧及厭氧條件下均可生長；

(ii) 利用 **API System** 之 API 50 CHL 鑑定套組，所得之測試結果如表 **8** 所示，鑑定分數為 93.6 (%ID)，鑑定結果為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)；

(iii) 以微生物電腦鑑定系統(Micro-IS System)進行本案分離株 B21T6 之鑑定，所得結果如表 7 所示，鑑定菌名為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)，鑑定分數達 0.682 (ID 計分)；

(iv) 本案分離株 B21T6 之 16S rDNA 序列分析結果如**第 6 圖**所示，將所得序列與 DNA 資料庫(MicroSeq™ Reference Manual, 1999, PE CO., USA)進行比對，發現本案分離株 B21T6 之 16 S rDNA 序列(SEQ ID NO:2)與 *Lactobacillus gasseri* [為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)族群中的 B_1 群]之 16S rDNA 序列相似度最高；

(v) 依上述之鑑定結果，本案之分離株 B21T6 最可能為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)族群中的 B_1 群--*Lactobacillus gasseri*；

表 8

菌株編號：B21T6

鑑定效果之描述：對於此菌屬顯示出有極佳的鑑定結果

測試條：API 50 CHL

結果(profile)：－－－－－－－－－－ －++－－－－－－－ －－+－－+++－－ －+－－－－－－－－ －－－－－－－－－－

50 種醣類反應結果

0	－	GLY	－	ERY	－	DARA	－	LARL	－	RIB	－	DXYL	－	LXYL	－	ADO	－	MDX	－	GAL	－
GLU	+	FRU	+	MNE	－	SBE	－	RHA	－	DUL	－	INO	－	MAN	－	SOR	－	MDM	－	MDG	－
NAG	+	AMY	+	ARB	－	ESC	+	SAL	+	CEL	+	MAL	+	LAC	－	MEL	－	SAC	+	TRE	－
INU	－	MLZ	－	RAF	－	AMD	－	GLYG	－	XLT	－	GEN	+	TUR	－	LYX	－	TAG	－	DFUC	－
LFUC	－	DARL	－	LARL	－	GNT	－	2KG	－	5KG	－										

明顯的分類		% Id.	T	針對菌種的試驗
可能的菌株名				
嗜酸乳桿菌(*Lacto. acidophilus*)	3	93.6	0.80	1
Lacto. Delb.delb.		6.0	0.65	5
下一個選擇				
Lacto. Crispatus		0.2	0.39	4

嗜酸乳桿菌(*Lacto. acidophilus*) 1： 1 針對下列之試驗(註：若要確立為嗜酸乳桿菌所建議之部分醣類再測試)

D-麥芽糖 (MAL) 75 %

3. 本發明之分離株 **C21T1**

(i) 依初步試驗決果，此分離株為革蘭氏陽性桿菌，不具過氧化氫酶，無可動性，在好氧及厭氧條件下均可生長；

(ii) 利用 **API System** 之 API 50 CHL 鑑定套組，所得之測試結果如表 **9** 所示，鑑定分數為 95.6 (%ID)，鑑定結果為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)；

(iii) 以微生物電腦鑑定系統(Micro-IS System)進行本案分離株 C21T1 菌株之鑑定，所得結果如表 **7** 所示，鑑定菌名為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)，鑑定分數達 0.682 (ID 計分)；

(iv) 本案分離株 C21T1 之 16S rDNA 序列分析結果如**第 7 圖**所示，將所得序列與 DNA 資料庫(MicroSeq™ Reference Manual, 1999, PE CO., USA)進行比對，發現本案分離株 C21T1 之 16S rDNA 序列(SEQ ID NO:3)與 *Lactobacillus gasseri* [為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)族群中的 B_1 群]之 16S rDNA 序列相似度最高；

(v) 依上述之鑑定結果，本案分離株 C21T1 最可能為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)族群中的 B_1 群 --*Lactobacillus gasseri*。

表 9

菌株編號：C21T1
鑑定效果之描述：良好的鑑定

測試條：API 50 CHL
結果(profile)：–––––––––– –++––––––– ––++–++++– –+–––––––+ ––––––––––
50 種醣類反應結果

0	–	GLY	–	ERY	–	DARA	–	LARL	–	RIB	–	DXYL	–	LXYL	–	ADO	–	MDX	–	GAL	–
GLU	+	FRU	+	MNE	–	SBE	–	RHA	–	DUL	–	INO	–	MAN	–	SOR	–	MDM	–	MDG	–
NAG	+	AMY	+	ARB	–	ESC	+	SAL	+	CEL	+	MAL	+	LAC	–	MEL	–	SAC	+	TRE	–
INU	–	MLZ	–	RAF	–	AMD	–	GLYG	–	XLT	–	GEN	+	TUR	–	LYX	–	TAG	–	DFUC	–
LFUC	–	DARL	–	LARL	–	GNT	–	2KG	–	5KG	–										

明顯的分類		% Id.	T	針對菌種的試驗
可能的菌株名				
嗜酸乳桿菌(*Lacto. acidophilus*)	1	95.6	0.70	3
下一個選擇				
Lacto. crispatus		1.5	0.53	5

嗜酸乳桿菌(*Lacto. acidophilus*) 1： 3 針對下列之試驗(註：若要確立為嗜酸乳桿菌所建議之部分醣類再測試)

半乳糖	(GAL)	75 %	D-甘露糖	(MNE)	96 %
海海藻糖	(TRE)	77 %			

4. 本發明之分離株 **X21B7**

(i) 依初步試驗決果，此分離株為革蘭氏陽性桿菌，不具過氧化氫酶，無可動性，在好氧及厭氧條件下均可生長；

(ii) 利用 **API System** 之 API 50 CHL 鑑定套組，所得之測試結果如表 **10** 所示，鑑定分數為 94.3 (%ID)，鑑定結果為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)；

(iii) 以微生物電腦鑑定系統(Micro-IS System)進行本案分離株 X21B7 之鑑定，所得結果如表 **7** 所示，鑑定菌名為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)，鑑定分數達 0.682 (ID 計分)；

(iv) 本案分離株 X21B7 之 16S rDNA 序列分析結果如第 8 圖所示，將所得序列與 DNA 資料庫(MicroSeq™ Reference Manual, 1999, PE CO., USA)進行比對，發現本案分離株 X21B7 之 16S rDNA 序列(SEQ ID NO:4)與 *Lactobacillus gasseri* [為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)族群中的 B_1 群]之 16S rDNA 序列相似度最高；

(v) 依上述之鑑定結果，本案分離株 X21B7 最可能為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)族群中的 B_1 群--*Lactobacillus gasseri*。

表 10

菌株編號：X21B7
鑑定效果之描述：良好的鑑定

測試條：API 50 CHL
結果(profile)：－－－－－－－－－－ ＋＋？－－－－－－－ －－＋＋－＋＋＋＋－ －＋－－－－－－－＋ －－－－－－－－－－
50 種醣類反應結果

0	－	GLY	－	ERY	－	DARA	－	LARL	－	RIB	－	DXYL	－	LXYL	－	ADO	－	MDX	－	GAL	＋
GLU	＋	FRU	?	MNE	－	SBE	－	RHA	－	DUL	－	INO	－	MAN	－	SOR	－	MDM	－	MDG	－
NAG	＋	AMY	＋	ARB	－	ESC	＋	SAL	＋	CEL	＋	MAL	＋	LAC	－	MEL	－	SAC	＋	TRE	－
INU	－	MLZ	－	RAF	－	AMD	－	GLYG	－	XLT	－	GEN	＋	TUR	－	LYX	－	TAG	－	DFUC	－
LFUC	－	DARL	－	LARL	－	GNT	－	2KG	－	5KG	－										

明顯的分類		% Id.	T	針對菌種的試驗
可能的菌株名				
嗜酸乳桿菌(*Lacto. acidophilus*)	1	94.3	0.65	2
下一個選擇				
有害片球菌(*Pediococcus Damnosus*)	2	2.0	0.43	3

嗜酸乳桿菌(*Lacto. acidophilus*) 1： 2 針對下列之試驗(註：若要確立為嗜酸乳桿菌所建議之部分醣類再測試)

D-甘露糖 E	(MNE)	96 %	海藻糖	(TRE)	77 %

5. 本發明之分離株 **B38T38**

(i) 依初步試驗決果，此分離株為革蘭氏陽性桿菌，不具過氧化氫酶，無可動性，在好氧及厭氧條件下均可生長；

(ii) 利用 API System 之 API 50 CHL 鑑定套組，所得之測試結果如表 11 所示，鑑定分數為 90.8 (%ID)，鑑定結果為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)；

(iii) 以微生物電腦鑑定系統(Micro-IS System)進行本案分離株 B38T38 菌株之鑑定，所得結果如表 12 所示，鑑定菌名為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)，鑑定分數達 0.646 (ID 計分)；

(iv) 本案分離株 B38T38 之 16S rDNA 序列分析結果如第 9 圖所示，將所得序列與 DNA 資料庫(MicroSeq™ Reference Manual, 1999, PE CO., USA)進行比對，發現本案分離株 B38T38 之 16S rDNA 序列(SEQ ID NO:5)與 *Lactobacillus gasseri* [為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)族群中的 B_1 群]之 16S rDNA 序列相似度最高；

(v) 依上述之鑑定結果，本案分離株 B38T38 最可能為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)族群中的 B_1 群--*Lactobacillus gasseri*。

表 11

菌株編號：B38T38

鑑定效果之描述：良好的鑑定

測試條：API 50 CHL

結果(profile)：−−−−−−−−−− ++++−−−−−− −−+−+++++− −++−−−−−−+ −−−−−−−−−−

50 種醣類反應結果

0	−	GLY	−	ERY	−	DARA	−	LARL	−	RIB	−	DXYL	−	LXYL	−	ADO	−	MDX	−	GAL	+
GLU	+	FRU	+	MNE	+	SBE	−	RHA	−	DUL	−	INO	−	MAN	−	SOR	−	MDM	−	MDG	−
NAG	+	AMY	−	ARB	+	ESC	+	SAL	+	CEL	+	MAL	+	LAC	−	MEL	−	SAC	+	TRE	+
INU	−	MLZ	−	RAF	−	AMD	−	GLYG	−	XLT	−	GEN	+	TUR	−	LYX	−	TAG	−	DFUC	−
LFUC	−	DARL	−	LARL	−	GNT	−	2KG	−	5KG	−										

明顯的分類		% Id.	T	針對菌種的試驗
可能的菌株名				
嗜酸乳桿菌(*Lacto. acidophilus*)	1	90.8	0.93	0
下一個選擇				
Lacto. delb.lactis	2	6.2	0.74	2

嗜酸乳桿菌(*Lacto. acidophilus*)　1：0　針對下列之試驗(註：若要確立為嗜酸乳桿菌所建議之部分醣類再測試)

表 12

Micro-IS 系統

菌株名稱：B38T38

−	013001	運動性	−	006001	內孢子
−	017013	生長 15℃	+	017017	生長 45℃
+	016059	好氣性生長	−	024045	葡萄糖成為 CO_2
−	028528	葡萄糖酸，氣體	+	025203	苦杏仁苷，酸
−	025181	L-阿拉伯糖，酸	+	025211	纖維二糖，酸
+	025193	D-果糖，酸	+	025194	D-半乳糖，酸
+	025195	D-葡萄糖，酸	+	025212	乳糖，酸
+	025213	麥芽糖，酸	−	026371	D-甘露糖醇，酸
+	025196	D-甘露糖，酸	+	025217	落葉松糖，酸
+	025214	木蜜二糖，酸	+	025218	植物蜜糖，酸
−	025191	L-鼠李糖，酸	−	025184	D-核糖，酸
+	025210	水楊甘，酸	−	026374	D-山梨糖醇，酸
+	025215	蔗糖，酸	+	025216	海藻糖，酸
−	025186	D-木糖，酸	−	028060	L-蘋果酸利用性

檢驗	**ID 計分	**可能性	**最佳可能性.
1 *L. delbrueckll ssp lactis*	0.64607	0.145038024	0.4351140
2 嗜酸乳桿菌	0.35240	0.079110108	0.0791101

建議再做的試驗	**成組的數值	**單獨的數值
1 024029 (L+) 乳酸生成		2
2 029268 L-精胺酸脫胺作用		2

6. 本發明之分離株 **B6T7**

(i) 依初步試驗決果，此分離株為革蘭氏陽性桿菌，不具過氧化氫酶，無可動性，在好氧及厭氧條件下均可生長；

(ii) 利用 API System 之 API 50 CHL 鑑定套組，所得之測試結果如表 13 所示，鑑定分數為 92.4 (%ID)，鑑定結果為植物乳桿菌(*Lactobacillus plantarum*)。

(iii) 以微生物電腦鑑定系統(Micro-IS System)進行本案分離株 B6T7 之鑑定，所得結果如表 7 所示，鑑定菌名為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)，鑑定分數達 0.682 (ID 計分)；

(iv) 本案之分離株 B6T7 之 16S rDNA 序列分析結果如第 10 圖所示。由於在 API 50 CHL 鑑定套組所的之結果與 Micro-IS System 鑑定系統所得結果分別為乳桿菌屬 (*Lactobacillus*) 中的植物乳桿菌 (*Lactobacillus plantarum*)與嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)，故將本案分離株 B6T7 所得之 16S rDNA 序列(SEQ ID NO:6)，與嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)之 DNA 序列 (SEQ ID NO:7) 以及植物乳桿菌 (*Lactobacillus plantarum*)之 DNA 序列(SEQ ID NO:8) 進行比對，發現本案分離株 B6T7 之 16S rDNA 序列與嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)之 16S rDNA 序列相似度最高，而與植物乳桿菌 (*Lactobacillus plantarum*)之 16S rDNA 序列相差甚大；

表 13

菌株編號：B6T7

鑑定效果之描述：可疑的態樣

測試條：API 50 CHL

結果(profile)：−−−−++−−−− ++++−+−−+− −−+++−++++ +++−−+−−−+ −−−−−−−−−−

50 種醣類反應結果

0 −	GLY −	ERY −	DARA −	LARL +	RIB +	DXYL −	LXYL −	ADO −	MDX −	GAL +
GLU +	FRU +	MNE +	SBE −	RHA +	DUL −	INO −	MAN +	SOR −	MDM −	MDG −
NAG +	AMY +	ARB +	ESC −	SAL +	CEL +	MAL +	LAC +	MEL +	SAC +	TRE +
INU −	MLZ −	RAF +	AMD −	GLYG −	XLT −	GEN +	TUR −	LYX −	TAG −	DFUC −
LFUC −	DARL −	LARL −	GNT −	2KG −	5KG −					

明顯的分類		% Id.	T	針對菌種的試驗
可能的菌株名				
植物乳桿菌(*Lacto. plantarum*)	1	92.4	0.59	3
下一個選擇				
唾液乳桿菌(*Lacto. salivarius*)		3.4	0.45	4

植物乳桿菌(*Lacto. plantarum*) 1： 3 針對下列之試驗(註：若要確立為嗜酸乳桿菌所建議之部分醣類再測試)

D-山梨糖醇	(SPR)	75 %	七葉甘	(ESC)	99 %
落葉松糖	(MLE)	92 %			

(v) 依上述之鑑定結果，本案分離株 B6T7 最可能為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)。

綜合以上鑑定結果，本發明所篩選之 6 株分離株皆屬於嗜酸乳桿菌株，其中 B6T7 為嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)，而 B21T1、B21T6、C21T1、X21B7 及 B38T38 為其 B_1 群的 *Lactobacillus gasser*。

參見表 14，當與習知專利案以及文獻中所揭示的乳桿菌菌株相比較，本發明所得之乳桿菌分離株不但可在含 0.3%膽鹽環境下生長，在 pH 2 之酸性環境下培養 2 小時後具有較高的存活率，具有良好降低膽固醇作用，且同時對膽固醇具有共沈澱作用及同化作用。由是顯見，本案之分離株及其繼代培養之後代會是優良的益生菌(probiotic bacteria)，而能供用於製備諸如飲料、糕點、嬰兒食品、發酵乳、營養補充品、動物飼料等之食用品，還有用於製備治療與預防腸胃疾病以及降低血清膽固醇用的藥學組成物。

舉例而言，可以參照 US 5,516,684 所揭示的參考例 1 (Referential Example 1)與參考例 2，將本發明所得之乳桿菌分離株拿來製造乳酸飲料(lactic acid beverage)以及發酵乳飲料(yogurt drink)。

表 14. 本發明的分離株與被揭示於前案專利及文獻中的已知菌株的比較

菌株	分離源	特徵	專利/文獻
嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) GG (ATCC 53103)	人類	1.耐膽鹽 可生長於含 0.15%膽汁酸之環境中 2.耐酸 在 pH 5 環境中，可生長至 10^9 CFU 在 pH 3 環境中，可生長至 10^7 CFU 在 pH 2.5 的胃汁中 30 分鐘後，菌數減少 2 個 log 值以內 在 pH 1～2/2 hr 後，菌數殘存 10^3 CFU 3.降膽固醇 可降低人類糞便中膽固醇的排泄量	US 4839281 US 5032399
嗜酸乳桿菌 (*L. acidophilus*) LA16	公豬	1.降膽固醇 可降低血清膽固醇 60% (於含 0.4%牛膽汁及 10 mg 膽固醇系統中) 動物試驗，餵食 56 天後，血清膽固醇可降低 10.5%，LDL-膽固醇含量可降低 9% (註： LA16 為嗜酸乳桿菌(*L. acidophilus*) DDS-1 (人類來源)製成之酸酪乳餵食豬隻後，再由豬糞中所分離出具有降膽固醇能力之菌株)	Danielson *et al.*, 1989
嗜酸乳桿菌 (*L. acidophilus*) ATCC 43121 ATCC 4356	豬 人類	1.耐膽鹽 0.3%牛膽汁下分別生長 2.93 及 7.4 小時，菌體濃度(OD_{620nm})可增加 0.3 單位 2.降膽固醇 可降低血清膽固醇 55.4%及 12.9% (於含 0.3%牛膽汁及 0.1% PPLO 系統中培養 14 小時後)	Gilliland and Walker, 1990
L. gasseri SBT 0274 SBT 0270	人類	1.耐膽鹽 可在含 0.3% 牛膽汁環境中生長 2.耐酸 在 pH 2.5，37℃/3 h，菌數下降 2 個 log 值 在 pH 1.5，37℃/2 h，菌數下降 4~5 個 log 值 3.降膽固醇 在含 0.3 %牛膽汁及 100 µg 膽固醇微胞/ml 系統中培養 20 小時後，可分別降低膽固醇含量 47 %及 36 %	Usman and Hosono, 1999
L. gasseri B21T1 B21T6 C21T1 X21B7 B38T38 嗜酸乳桿菌 (*L. acidophilus*) B6T7	健康幼兒	1.耐膽鹽 在含 0.3 %牛膽汁下生長 24 h，菌株殘存量達 80%，即菌數減少 0.5~2 個 log 值 2.耐酸 在 pH 2，37℃/2 hr 處理菌數減少 3～4 個 log 值 (0.85 % NaCl/0.01 N HCl 系統) 3.降膽固醇 在含 0.3 %牛膽汁及 12%馬血清之 MRS 肉湯培養基系統中，厭氧培養 24 hr，可降低膽固醇含量達 93%以上 在含 0.3%牛膽汁及 12%膽固醇微胞之 MRS 肉湯培養基系統中，厭氧培養 24hr，可降低膽固醇含量達 25~45% 對膽固醇吸附同化效果達 12~40%	本發明菌株

註：ATCC 43121＝ CCRC 17064　　ATCC 4356 ＝ CCRC 10695
PPLO (BACT PPLO SERUM FRACTION)係由 DIFCO LABORARORIES所出品，目前已經停產

於本說明書中被引述之所有專利和文獻以其整體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案詳細說明(包含界定在內)將佔上風。

雖然本發明已參考上述特定的具體例被描述，明顯地在不背離本發明之範圍和精神之下可作出很多的修改和變化。因此意欲的是，本發明僅受如隨文檢附之申請專利範圍所示者之限制。

本發明的6個乳桿菌分離株已於西元2002年6月18日寄存於食品工業發展研究所的「生物資源保存及研究中心」(BCRC，簡稱生資中心)] [註：該中心之舊名為菌種保存中心(CCRC)，已於九十一年元月公告更名](中華民國台灣省300新竹市食品路331號)，寄存編號分別為：

Lactobacillus gasseri B21T1	CCRC 910195
Lactobacillus gasseri B21T6	CCRC 910196
Lactobacillus gasseri C21T1	CCRC 910198
Lactobacillus gasseri X21B7	CCRC 910199
Lactobacillus gasseri B38T38	CCRC 910197
嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)B6T7	CCRC 910194

此等分離株亦有依據布達佩斯條約之規定，於西元2002年6月21日被寄存於美國類型培養物收集中心(ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA)，寄存編號分別為：

Lactobacillus gasseri B21T1	PTA-4483
Lactobacillus gasseri B21T6	PTA-4484
Lactobacillus gasseri C21T1	PTA-4479
Lactobacillus gasseri X21B7	PTA-4480
Lactobacillus gasseri B38T38	PTA-4481
嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)B6T7	PTA-4482

序列表

<110> 劉玉茹
游金珠
譚靜芬
廖啓成

<120>具有降低與同化膽固醇能力的新穎耐酸與耐膽鹽乳桿菌(*Lactobicillus*)分離株
<160> 8
<170> Microsoft Word 2000

<210> 1
<211> 500
<212> DNA
<213> Lactobacillus gasseri B21T1

<220>
<223> 16S ribosomal DNA

<400> 1

```
caggacgaac gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcgagcttg cctagatgaa      60

tttggtgctt gcaccaaatg aaactagata caagcgagcg gcggacgggt gagtaacacg     120

tgggtaacct gcccaagaga ctgggataac acctggaaac agatgctaat accggataac     180

aacactagac gcatgtctag agtttaaaag atggttctgc tatcactctt ggatggacct     240

gcggtgcatt agctagttgg taaggtaacg gcttaccaag gcaatgatgc atagccgagt     300

tgagagactg atcggccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc     360

agtagggaat cttccacaat ggacgcaagt ctgatggagc aacgccgcgt gagtgaagaa     420

gggtttcggc tcgtaaagct ctgttggtag tgaagaaaga tagaggtagt aactggcctt     480

tatttgacgg taattactta                                                 500
```

<210> 2
<211> 500
<212> DNA
<213> Lactobacillus gasseri B21T6

<220>
<223> 16S ribosomal DNA

<400> 2

```
caggacgaac gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcgagcttg cctagatgaa      60

tttggtgctt gcaccaaatg aaactagata caagcgagcg gcggacgggt gagtaacacg     120

tgggtaacct gcccaagaga ctgggataac acctggaaac agatgctaat accggataac     180

aacactagac gcatgtctag agtttaaaag atggttctgc tatcactctt ggatggacct     240

gcggtgcatt agctagttgg taaggtaacg gcttaccaag gcaatgatgc atagccgagt     300

tgagagactg atcggccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc     360

agtagggaat cttccacaat ggacgcaagt ctgatggagc aacgccgcgt gagtgaagaa     420

gggtttcggc tcgtaaagct ctgttggtag tgaagaaaga tagaggtagt aactggcctt     480

tatttgacgg taattactta                                                 500
```

<210> 3
<211> 500
<212> DNA
<213> Lactobacillus gasseri C21T1

<220>
<223> 16S ribosomal DNA

<400> 3

caggacgaac gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcgagcttg cctagatgaa 60

tttggtgctt gcaccaaatg aaactagata caagcgagcg gcggacgggt gagtaacacg 120

tgggtaacct gcccaagaga ctgggataac acctggaaac agatgctaat accggataac 180

aacactagac gcatgtctag agtttaaaag atggttctgc tatcactctt ggatggacct 240

gcggtgcatt agctagttgg taaggtaacg gcttaccaag gcaatgatgc atagccgagt 300

tgagagactg atcggccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc 360

agtagggaat cttccacaat ggacgcaagt ctgatggagc aacgccgcgt gagtgaagaa 420

gggtttcggc tcgtaaagct ctgttggtag tgaagaaaga tagaggtagt aactggcctt 480

tatttgacgg taattactta 500

<210> 4
<211> 500
<212> DNA
<213> Lactobacillus gasseri X21B7

<220>
<223> 16S ribosomal DNA

<400> 4

caggacgaac gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcgagcttg cctagatgat 60

tttggtgctt gcactaaatg aaactagata caagcgagcg gcggacgggt gagtaacacg 120

tgggtaacct gcccaagaga ctgggataac acctggaaac agatgctaat accggataac 180

aacactagac gcatgtctag agtttgaaag atggttctgc tatcactctt ggatggacct 240

gcggtgcatt agctagttgg taaggtaacg gcttaccaag gcaatgatgc atagccgagt 300

tgagagactg atcggccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc 360 agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt ctgatggagc aacgccgcgt gagtgaagaa 420

gggtttcggc tcgtaaagct ctgttggtag tgaagaaaga tagaggtagt aactggcctt 480

tatttgacgg taattactta 500

<210> 5
<211> 500
<212> DNA
<213> Lactobacillus gasseri B38T38

<220>
<223> 16S ribosomal DNA

<400> 5

caggacgaac gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcgagcttg cctagatgaa 60

tttggtgctt gcaccaaatg aaactagata caagcgagcg gcggacgggt gagtaacacg 120

tgggtaacct gcccaagaga ctgggataac acctggaaac agatgctaat accggataac 180

aacactagac gcatgtctag agtttaaaag atggttctgc tatcactctt ggatggacct 240

gcggtgcatt agctagttgg taaggtaacg gcttaccaag gcaatgatgc atagccgagt 300

tgagagactg atcggccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc 360

agtagggaat cttccacaat ggacgcaagt ctgatggagc aacgccgcgt gagtgaagaa 420

gggtttcggc tcgtaaagct ctgttggtag tgaagaaaga tagaggtagt aactggcctt 480

tatttgacgg taattactta 500

<210> 6
<211> 480
<212> DNA
<213> Lactobacillus acidophilus B6T7

<220>

<223> 16S ribosomal DNA

<400> 6

cagacgaacg ctggcggcgt gcctaataca tgcaagtcga gcgacctgaa ccaacagatt 60

cacttcggtg atgacgttgg gaacgcgagc ggcggatggg tgagtaacac gtggggaccc 120

tgccccatag tctgggatac cacttggaaa caggtgcaat accggataag aaagcagatg 180

ccatgatcag cttataaaag gcggcgtaag ctgtcgctat gggatggccc cgcggtgcat 240

tagctagttg gtagggtaac ggcctaccaa ggcaatgatg catagccgag tttgagagac 300

tgatccggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggg caagcagtag 360

ggaatcctcc acaatggacc aaagtcctga tggagcaacg ccccgtgagt tgaagaagtt 420

ttcggatcgt aaagccctgt tgttggtgaa gaaggataga ggtaagaact ggcctttatt 480

<210> 7
<211> 480
<212> DNA
<213> Lactobacillus acidophilus

<220>
<223> 16S ribosomal DNA

<400> 7

caggacgaac gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcgagctga accaacagat 60

tcacttcggt gatgcagttg ggaacgcgag cggcggatgg gtgagtaaca cgtggggaac 120

ctgccccata gtctgggata ccacttggaa acaggtgcaa taccggataa gaaagcagat 180

gccatgatca gcttataaaa ggcggcgtaa gctgtcgcta tgggatggcc ccgcggtgca 240

ttagctagtt ggtagggtaa cggcctacca aggcaatgat gcatagccga gttgagagac 300 tgatcggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga 360

atcttccaca atggacgaaa gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aaggttttcg 420

gatcgtaaag ctctgttgtt ggtgaagaag gatagaggta gtaactggcc tttatttgac 480

<210> 8
<211> 480
<212> DNA
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<223> 16S ribosomal DNA

<400> 8

caggacgaac gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg aacgaactct ggtattgatt 60

ggtgcttgca tcatgattta catttgagtg agtggcgaaa tggtgagtaa cavgtgggaa 120

acctgcccag aagcggggga taacacctgg aaacagatgc taataccgca taacaacttg 180

gaccgcatgg tccgagttga aagatggctt cggctatcac ttttggatgg tcccgcggcg 240

tattagctag atgctggggt aacggctcac catggcaatg atacgtagcc gacctgagag 300

ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg 360

gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc gcgtgagtga agaagggttt 420

cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga gagtaactgt tcaggtattg 480

六、申請專利範圍

1. 一種乳桿菌物種(*Lactobacillus sp.*)之分離株，其菌學特徵(bacteriological characteristics)相同於*Lactobacillus gasseri* B21T1所具者，該*Lactobacillus gasseri* B21T1被寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為CCRC 910195，以及寄存於美國類型培養物收集中心(ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA)，寄存編號為ATCC PTA-4483。
2. 一種乳桿菌物種(*Lactobacillus sp.*)之分離株，其菌學特徵相同於*Lactobacillus gasseri* B21T6所具者，該*Lactobacillus gasseri* B21T6被寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為CCRC 910196，以及被寄存於美國類型培養物收集中心，寄存編號為ATCC PTA-4484。
3. 一種乳桿菌物種(*Lactobacillus sp.*)之分離株，其菌學特徵相同於*Lactobacillus gasseri* C21T1所具者，該*Lactobacillus gasseri* C21T1被寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為CCRC 910198，以及被寄存於美國類型培養物收集中心，寄存編號為ATCC PTA-4479。
4. 一種乳桿菌物種(*Lactobacillus sp.*)之分離株，其菌學特徵相同於*Lactobacillus gasseri* X21B7所具者，該*Lactobacillus gasseri* X21B7被寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為CCRC 910199，以及被寄存於美國類型培養物收集中心，寄存編號為ATCC PTA-4480。
5. 一種乳桿菌物種(*Lactobacillus sp.*)之分離株，其菌學特徵相同於*Lactobacillus gasseri* B38T38所具者，該

六、申請專利範圍

Lactobacillus gasseri B38T38被寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為CCRC 910197，以及被寄存於美國類型培養物收集中心，寄存編號為ATCC PTA-4481。

6. 一種乳桿菌物種(*Lactobacillus sp.*)之分離株，其菌學特徵相同於嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) B6T7所具者，該嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*) B6T7被寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為CCRC 910194，以及被寄存於美國類型培養物收集中心，寄存編號為ATCC PTA-4482。

7. 一種食品產品，其包含有一可食性材料與一如申請專利範圍第1至6項中任一項之乳桿菌物種(*Lactobacillus sp.*)分離株或其繼代培養後代或由此等所衍生出的突變株。

8. 如申請專利範圍第7項之食品產品，其進一步包含至少一種選自於下列群組中的益生性生物：乳桿菌屬物種，如嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)、乳酸乳桿菌(*Lactobacillus lactis*)、短乳桿菌(*Lactobacillus brevis*)、乳酪乳桿菌(*Lactobacillus casei*)、植物乳桿菌(*Lactobacillus plantarum*)、唾液乳桿菌(*Lactobacillus salivarius*)、雙歧乳桿菌(*Lactobacillus bifidus*)、保加利亞乳桿菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、高加索乳桿菌(*Lactobacillus causasicus*)以及鼠李糖乳桿菌(*Lactobacillus rhamnosus*)；鏈球菌屬物種，如嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)、乳酸鏈球菌

六、申請專利範圍

(*Streptococcus lactis*)；酵母菌，如念珠菌屬物種*Candida Kefyr*、弗羅稜酵母菌(*Saccharomyces florentinus*)；或此等菌種之組合。

9. 如申請專利範圍第7項之食品產品，其中該可食性材料係選自於下列群組：流體乳品(牛奶、濃縮牛奶)，發酵乳品(優酪乳、酸乳、冷凍優格、乳酸菌發酵飲料)，奶粉，冰淇淋，乳酪，乾酪，豆奶與發酵豆奶，蔬果汁、果汁及運動飲料等飲料，甜點，糖果，嬰兒食品，食療產品，動物飼料，以及膳食補充品。

10. 如申請專利範圍第7項之食品產品，其被製造成為即溶沖泡食品。

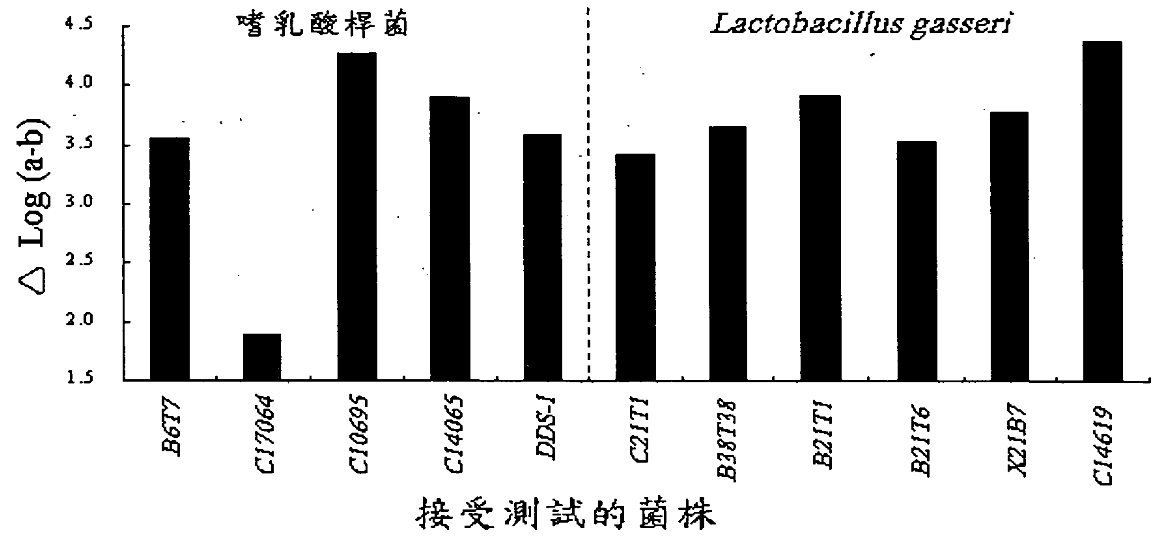
11. 一種藥學組成物，其包含有一益生性有效數量之一如申請專利範圍第1至6項中任一項之乳桿菌物種(*Lactobacillus sp.*)分離株或其繼代培養後代或由此等所衍生出的突變株。

12. 如申請專利範圍第10項之藥學組成物，其中該組成物被配製成一選自於下列群組中之供用於口服投藥的形式：溶液、乳劑、粉末、錠劑以及膠囊。

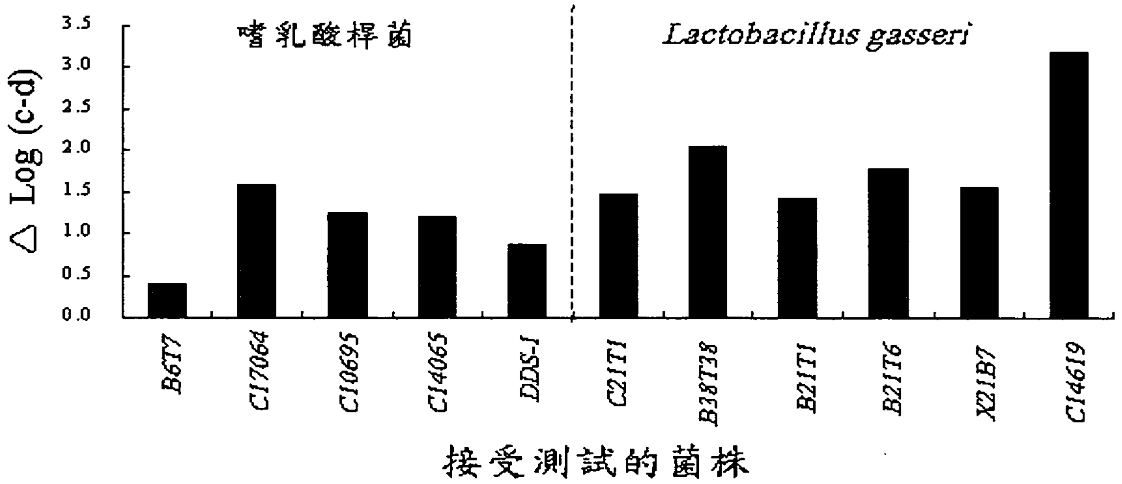
13. 如申請專利範圍第10項之藥學組成物，其中該組成物被製作為消化整腸藥劑。

14. 如申請專利範圍第10項之藥學組成物，其中該組成物被製作為用以降低血清膽固醇的藥品。

圖式



第 1 圖



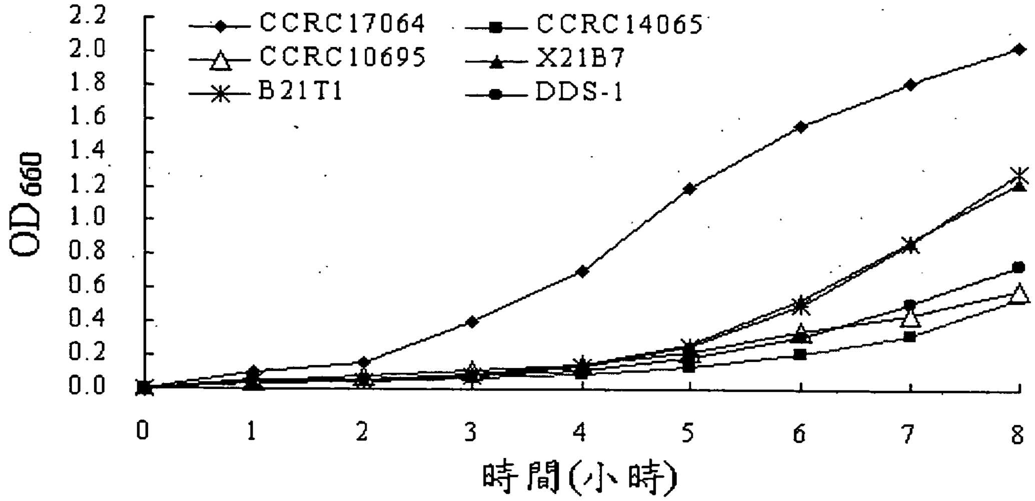
第 2 圖

（請先閱讀背面之注意事項再行繪製）

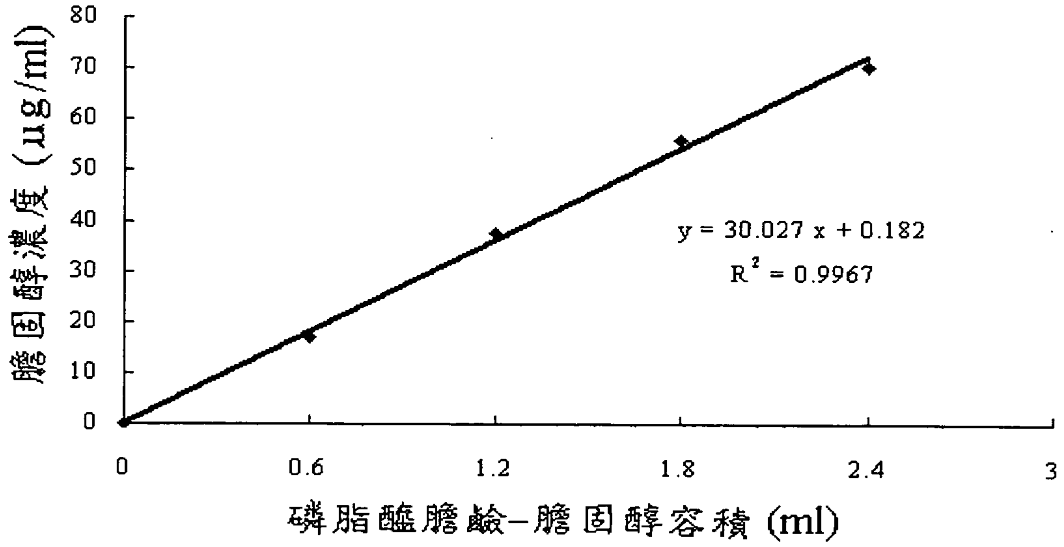
裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

[illegible]圖式



第 3 圖



第 4 圖

（請先閱讀背面之注意事項再行繪製）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再行繪製）
裝
訂
線

圖式

```
CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCGAGCTTG
CCTAGATGAA TTTGGTGCTT GCACCAAATG AAACTAGATA CAAGCGAGCG
GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCAAGAGA CTGGGATAAC
ACCTGGAAAC AGATGCTAAT ACCGGATAAC AACACTAGAC GCATGTCTAG
AGTTTAAAAG ATGGTTCTGC TATCACTCTT GGATGGACCT GCGGTGCATT
AGCTAGTTGG TAAGGTAACG GCTTACCAAG GCAATGATGC ATAGCCGAGT
TGAGAGACTG ATCGGCCACA TTGGGACTGA GACACGGCCC AAACTCCTAC
GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCACAAT GGACGCAAGT CTGATGGAGC
AACGCCGCGT GAGTGAAGAA GGGTTTCGGC TCGTAAAGCT CTGTTGGTAG
TGAAGAAAGA TAGAGGTAGT AACTGGCCTT TATTTGACGG TAATTACTTA
```

第 5 圖

```
CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCGAGCTTG
CCTAGATGAA TTTGGTGCTT GCACCAAATG AAACTAGATA CAAGCGAGCG
GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCAAGAGA CTGGGATAAC
ACCTGGAAAC AGATGCTAAT ACCGGATAAC AACACTAGAC GCATGTCTAG
AGTTTAAAAG ATGGTTCTGC TATCACTCTT GGATGGACCT GCGGTGCATT
AGCTAGTTGG TAAGGTAACG GCTTACCAAG GCAATGATGC ATAGCCGAGT
TGAGAGACTG ATCGGCCACA TTGGGACTGA GACACGGCCC AAACTCCTAC
GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCACAAT GGACGCAAGT CTGATGGAGC
AACGCCGCGT GAGTGAAGAA GGGTTTCGGC TCGTAAAGCT CTGTTGGTAG
TGAAGAAAGA TAGAGGTAGT AACTGGCCTT TATTTGACGG TAATTACTTA
```

第 6 圖

```
CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCGAGCTTG
CCTAGATGAA TTTGGTGCTT GCACCAAATG AAACTAGATA CAAGCGAGCG
GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCAAGAGA CTGGGATAAC
ACCTGGAAAC AGATGCTAAT ACCGGATAAC AACACTAGAC GCATGTCTAG
AGTTTAAAAG ATGGTTCTGC TATCACTCTT GGATGGACCT GCGGTGCATT
AGCTAGTTGG TAAGGTAACG GCTTACCAAG GCAATGATGC ATAGCCGAGT
TGAGAGACTG ATCGGCCACA TTGGGACTGA GACACGGCCC AAACTCCTAC
GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCACAAT GGACGCAAGT CTGATGGAGC
AACGCCGCGT GAGTGAAGAA GGGTTTCGGC TCGTAAAGCT CTGTTGGTAG
TGAAGAAAGA TAGAGGTAGT AACTGGCCTT TATTTGACGG TAATTACTTA
```

第 7 圖

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

圖式

CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCGAGCTTG
CCTAGATGAT TTTGGTGCTT GCACTAAATG AAACTAGATA CAAGCGAGCG
GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCAAGAGA CTGGGATAAC
ACCTGGAAAC AGATGCTAAT ACCGGATAAC AACACTAGAC GCATGTCTAG
AGTTTGAAAG ATGGTTCTGC TATCACTCTT GGATGGACCT GCGGTGCATT
AGCTAGTTGG TAAGGTAACG GCTTACCAAG GCAATGATGC ATAGCCGAGT
TGAGAGACTG ATCGGCCACA TTGGGACTGA GACACGGCCC AAACTCCTAC
GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCACAAT GGACGAAAGT CTGATGGAGC
AACGCCGCGT GAGTGAAGAA GGGTTTCGGC TCGTAAAGCT CTGTTGGTAG
TGAAGAAAGA TAGAGGTAGT AACTGGCCTT TATTTGACGG TAATTACTTA

第 8 圖

CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCGAGCTTG
CCTAGATGAA TTTGGTGCTT GCACCAAATG AAACTAGATA CAAGCGAGCG
GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCAAGAGA CTGGGATAAC
ACCTGGAAAC AGATGCTAAT ACCGGATAAC AACACTAGAC GCATGTCTAG
AGTTTAAAAG ATGGTTCTGC TATCACTCTT GGATGGACCT GCGGTGCATT
AGCTAGTTGG TAAGGTAACG GCTTACCAAG GCAATGATGC ATAGCCGAGT
TGAGAGACTG ATCGGCCACA TTGGGACTGA GACACGGCCC AAACTCCTAC
GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCACAAT GGACGCAAGT CTGATGGAGC
AACGCCGCGT GAGTGAAGAA GGGTTTCGGC TCGTAAAGCT CTGTTGGTAG
TGAAGAAAGA TAGAGGTAGT AACTGGCCTT TATTTGACGG TAATTACTTA

第 9 圖

（請先閱讀背面之注意事項再行繪製）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

圖式

```
B6T7  CA-GACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCG - AC - CT
La    CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCG - AG - CT
Lp    CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AACGAACTCT
      - - * - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - * - - * - * * - -

B6T7  - GAACCAACA GAT - - TCACT TCGGTGA - TG ACGTTGGGAA CGCGAGCGGC
La    - GAACCAACA GAT - - TCACT TCGGTGA - TG ACGTTGGGAA CGCGAGCGGC
Lp    GGTATTGATT GGTGCTTGCA TC - ATGATTT ACATT - TG - A - GTGAGTGGC
      * - * - * * * - * * - * - * * - * * - * - - * * - - - * - * - - * - - * * - * - * - * - - - - * - - -

B6T7  GGATGGGTGA GTAACACGTG GGAACCTGC CCCAT - AGTC TGGGATACCA
La    GGATGGGTGA GTAACACGTG GGAACCTGC CCCAT - AGTC TGGGATACCA
Lp    GAACTGGTGA GTAACACGTG GGAAACCTG - CCCAGAAGCG GGGGATAACA
      - * - * * - - - - - - - - - - - - - - - - - * - - - - - - * - - - - * * - - * * * - - - - - - - * - -

B6T7  CTTGGAAACA GGTGCAATA CCGGATAAGA AAGCAGATGC CATGATCAGC
La    CTTGGAAACA GGTGCAATA CCGGATAAGA AAGCAGATGC CATGATCAGC
Lp    CCTGGAAACA GATGCTAATA CCGCATAACA ACTTGGACCG CATGGTCCGA
      - * - - - - - - - - - * - - - - - - - - - - - - - * - - - - * - - * * * * - - * - - - - - - - * - - - * - *

B6T7  TTATAAAAGG CGGCGTAAGC TGTCGCTATG GGATGGCCCC GCGGTGCATT
La    TTATAAAAGG CGGCGTAAGC TGTCGCTATG GGATGGCCCC GCGGTGCATT
Lp    G - TTGAAAGA TGGCTTCGGC TATCACTTTT GGATGGTCCC GCGGCGTATT
      * * * - * - - - - * - * - - - - - - - - - - * - - - - - - - - - - - - - * - - - - * - - * * * * - - * - -

B6T7  AGCTAGTTGG TAGGGTAACG GCCTACCAAG GCAATGATGC ATAGCCGAGT
La    AGCTAGTTGG TAGGGTAACG GCCTACCAAG GCAATGATGC ATAGCCGAG-
Lp    AGCTAGATGC TGGGGTAACG GCTCACCATG GCAATGATAC GTAGCCGA - C
      - - - - * - - * - * * * * - * - - - - * * - - - * - * * - - - * - - * - - * - * - - - - - - - - * - - -

B6T7  TTGAGAGACT GATCCGGCCA CATTGGGACT GAGACACGGC CCAAACTCCT
La    TTGAGAGACT GAT-CGGCCA CATTGGGACT GAGACACGGC CCAAACTCCT
Lp    CTGAGAGGGT AAT - CGGCCA CATTGGGACT GAGACACGGC CCAAACTCCT
      * - - - - - - - * * - * - - * - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

B6T7  ACGGGAGGGC AAGCAGTAGG GAATCCTCCA CAATGGACCA AAGTCCTGAT
La    ACGGGA-GGC -AGCAGTAGG GAATCTTCCA CAATGGACGA AAGT-CTGAT
Lp    ACGGGA - GGC - AGCAGTAGG GAATCTTCCA CAATGGACGA AAGT - CTGAT
      - - - - - - * - - - * - - - - - - - - - - - - - - * - - - - - - - - - - - - - * - - - - - - * - - - - -

B6T7  GGAGCAACGC CCCGTGAGTT GAAGAA-GTT TTCGGATCGT AAAGCCCTGT
La    GGAGCAACGC CGCGTGAG-T GAAGAAGGTT TTCGGATCGT AAAGCTCTGT
Lp    GGAGCAACGC CGCGTGAG - T GAAGAAGGGT TTCGGCTCGT AAAACTCTGT
      - - - - - - - - - - - - * - - - - - - - * - - - - - - - * - * - - - - - - * - - - - - - - * - * - - - -

B6T7  TGTTGGTGAA GAAGGATA - G AGGTAAGAAC TG - GCCTTTA TTTGACCGTA
La    TGTTGGTGAA GAAGGATA - G AGGTAGTAAC TG - GCCTTTA TTTGACGGTA
Lp    TGTTAAAGAA GAA - CATATC TGAGAGTAAC TGTTCAGGTA - TTGACGGTA
      - - - - * * * - - - - - - - * * - - - * * * - * * - * * - - - - - * * - * * * - - * - - - - - - * - - -
```

第 10 圖

（請先閱讀背面之注意事項再行繪製）

裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製